

**Utilização de mutantes para a identificação de genes  
envolvidos na produção de biofilmes de *Listeria  
monocytogenes***

**Ana Rita Rodrigues dos Santos**

Dissertação para obtenção do grau de mestre em  
**Engenharia Alimentar**

Orientadora: Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito

Co-orientador: Doutor António Clara Abreu Afonso Lourenço

**Juri:**

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com agregação  
do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora Auxiliar com agregação  
do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutora Teresa Maria Leitão Semedo Lemsaddek



## **Agradecimentos**

Realizar uma tese de mestrado exige muito de nós, mas também de quem está á nossa volta. Por isso quero expressar os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que fizeram parte deste percurso, pois todos contribuíram de alguma forma.

Agradeço à Professora Doutora **Luísa Brito**, por ser minha orientadora, pela paciência, carinho, generosidade, apoio, disponibilidade e por todos os conhecimentos que me transmitiu, um enorme OBRIGADO.

Ao Doutor **António Lourenço**, pela amizade, disponibilidade, paciência, dedicação e por todos os conhecimentos transmitidos.

À Mestre **Ana Carla Silva** pela amizade, força e boa disposição e por todos os conhecimentos adquiridos ao longo do trabalho.

À Doutora **Paula Cabrita** pelo apoio, força e amizade.

Ao Doutor **Maesh Chandra** pela boa disposição e incentivo

A todos os membros do laboratório de Fisiologia, em especial à **Catarina** e à **Juliana** pela boa disposição, carinho, preocupação e auxílio.

À D. **Lena** e D. **Manuela** por toda a ajuda na preparação do material, paciência e amizade. Por todas as conversas animadas, apoio e carinho que sempre demonstraram.

À **Annalisa** e **Vânia** pela boa disposição e companheirismo demonstrado.

À **Barbara Vinhas** e à **Filipa Nascimento** por toda a amizade, carinho e apoio incondicional. Pelos nossos momentos de diversão e gargalhadas. Sem vocês estes 10 meses não teriam sido a mesma coisa.

À **Ana Custódio** e **Patrícia Marques** por preencherem estes dois anos de vida académica com muita amizade, companheirismo e momentos de diversão como só nós sabemos. Pelo apoio e força sempre que precisei. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

À minha amiga **Cláudia Martins** por fazer parte da minha vida desde o primeiro dia de faculdade. Obrigada por todos os momentos partilhados, pela nossa cumplicidade e amizade. Obrigada pela motivação, força, apoio incondicional e por me lembrares de que sou capaz! Obrigada por tudo, minha linda!

Aos meus amigos, **Ana Rita Lopes, Ana Sofia Torres, Mónica Duarte, Sara Guerreiro e Cláudio Ferreira**, que contribuem diariamente para a minha felicidade. Obrigado por todo o apoio e motivação. Obrigada por serem pessoas maravilhosas e fazerem parte da minha vida.

Ao meu namorado **Bruno Costa**, por todo o apoio, incentivo e motivação nesta difícil etapa, mas sobretudo pelo teu amor e por todos os momentos maravilhosos que me proporcionas.

Por último, mas com maior importância, aos meus **pais**. Obrigada por TUDO! Obrigada por estarem sempre presentes, e pelo apoio incondicional. Obrigada por tudo o que proporcionam, sem vocês nada disto teria sido possível. Vocês representam tudo para mim. As palavras nunca alcançarão os meus sentimentos por vocês. Amo-vos muito.

Agradeço também à minha irmã **Carla** e aos meus sobrinhos, **Rúben e Lara** por tudo.

## Resumo

*Listeria monocytogenes* é considerada uma bactéria de difícil erradicação na indústria alimentar pela sua capacidade de formação de biofilmes.

Neste trabalho a capacidade de formação de biofilme foi avaliada em cinco estirpes de *L. monocytogenes* (a estirpe selvagem EGDe e os quatro mutantes desta estirpe, nos genes *fliF*, *fliI*, *tatAC* e *Imo0364*).

O sistema Tat é responsável pela secreção de proteínas na sua fase final de conformação. O gene *Imo0364* codifica um regulador transcripcional tendo ainda sido pouco estudado.

As proteínas envolvidas nos flagelos estão relacionadas com a mobilidade das bactérias, desempenhando também um papel crucial na fixação celular inicial e subsequente formação de biofilme.

Foram utilizados os métodos do cristal violeta, vermelho de ruténio e enumeração de células viáveis em aço inoxidável. A produção de biofilme foi avaliada à temperatura de 25 °C e de 37 °C em meio de cultura complexo TSB e meio mínimo MWB.

Em comparação com a estirpe selvagem, os resultados obtidos parecem indicar uma menor capacidade de produção de biofilme pelos mutantes flagelares, salientando a importância dos flagelos na produção de biofilme por *L. monocytogenes*.

## Palavras-chave

*Listeria monocytogenes*, biofilme, mutante, exoproteínas, flagelos, sistemas de secreção.

## **Abstract**

*Listeria monocytogenes* is a bacteria considered difficult to eradicate in food industry due to its ability to form biofilms.

The ability of biofilm formation was evaluated in five *L. monocytogenes* strains (the wild type EGDe and four mutants of this strain, at gene *fliF*, *flil*, *tatAC* and *lmo0364*).

The Tat system is responsible for secretion of proteins in their final phase of conformation. The *lmo0364* gene encodes for a transcriptional regulator that has been poorly studied.

The flagella are proteins involved in the mobility of the bacteria and play a crucial role in the initial and subsequent steps of biofilm formation and cell attachment.

The crystal violet, the ruthenium red and the enumeration of cells in stainless steel assays were used. The biofilm production was evaluated at 25 ° C and 37 ° C in TSB and MWB medium.

The results indicate a reduced ability of flagellar mutants to produce biofilm when compared to its wild type, showing the importance of flagella to produce biofilm in *L. monocytogenes*.

## **Keywords**

*Listeria monocytogenes*, biofilm, mutant, exoproteins, flagella, secretion systems.

## Extend Abstract

*Listeria monocytogenes* is a bacterium considered difficult to eradicate in the food industry due to its ability to form biofilms. This pathogen is recognized as the causative agent of listeriosis, a serious public health concern coupled with a high mortality rate, especially among immunocompromised hosts.

*L. monocytogenes* is a gram-positive bacterium of low G+C content ( $\pm 38\%$ ). These bacteria are catalase positive and oxidase negative. Morphologically they have the form of a short rod with a diameter of 0.5  $\mu\text{m}$  and a length between 0.5 and 2.0  $\mu\text{m}$ . The main characteristic of *L. monocytogenes* is its versatility with respect to growth conditions, including temperature (1.5 – 45 °C), pH (4.3 – 9.6) and water activity ( $\geq 0.90$ ). They are facultative anaerobes that do not form a capsule, do not form spores, and are motile by peritrichous flagella when cultured at 20–25 °C and non-motile at 37 °C.

The secretion of proteins is extremely important, for the bacteria, both in the colonization of biotic and abiotic environments as well as for its virulence.

The Tat system, one of the secretion systems present in *L. monocytogenes*, is responsible for secretion of proteins in their final conformation stage. In *L. monocytogenes*, strain EGDe, the two proteins that constitute the Tat pathway are encoded in the genes *tatC* (*Imo0361*) and *tatA* (*Imo0362*). Adjacent to the Tat operon, there is an operon formed by genes *Imo0365*, *Imo0366* and *Imo0367*, related to iron metabolism. Between the two *locus* mentioned there is a gene coding for a transcriptional regulator, *Imo0364*. This gene is poorly studied.

The flagella are involved in the mobility of the bacteria and play a crucial role in the initial and subsequent steps of cell attachment and biofilm formation. The *Imo0761* encodes a protein similar to an ATPase (FliI) and *Imo0716* encodes a component of the flagellar basal body (FliF).

The exoproteins are an important class of molecules that participate in several physiological processes such as cell signaling and pathogenesis. The comparison of exoproteomes from *L. monocytogenes* biofilms has allowed the identification of proteins with higher expression in biofilm state.

The *Imo1438* gene encodes a penicillin binding protein, which is responsible for the final steps of peptidoglycan exoskeleton synthesis. This protein is also a molecular target for  $\beta$ -lactam antibiotics and play a crucial role in cell division.

The ability of biofilm formation was evaluated in five strains of *L. monocytogenes* (the wild type and four mutant strains *fliF*, *fliI*, *tatAC* and *Imo0364*), based on crystal violet,

ruthenium red and on the enumeration of cells in stainless steel assays. The biofilm production was evaluated at 25 and 37 °C in complex TSB and minimal MWB media.

With the ruthenium red assay, the results were not conclusive and the standard error were very high. A possible explanation may be the fact that the ruthenium red can bind to other carbohydrates present on cell surface that are related with biofilms.

At 37°C, in MWB, with the crystal violet and stainless steel coupons, the mutant  $\Delta fliI$  showed a reduced ability to produce biofilm, compared to the wild type. With the crystal violet assay, the other flagellar mutant ( $\Delta FliF$ ) also showed a lower ability to form biofilm (in both temperatures in MWB medium and at 37 °C in TSB).

With the stainless steel coupons assay, the  $\Delta Imo0364$  showed a reduced ability to form biofilm (TSB, 25 °C) compared with the wild type. More studies are necessary to clarify the role of this gene in the ability of *L. monocytogenes* to form biofilms.

The wild type EGDe, in general, showed with crystal violet assay, a higher production of biofilm in minimal medium MWB at 37 °C.

## **Keywords**

*Listeria monocytogenes*, biofilm, mutante, exoproteins, flagella, secretion systems.



## Índice

1. Introdução.....	1
1.1 Características gerais de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	1
1.2 Factores que afectam a sobrevivência e o crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	2
1.3 Listeriose e factores de virulência .....	3
1.4 Impacto de <i>Listeria monocytogenes</i> na indústria alimentar .....	6
1.5 Biofilmes bacterianos .....	6
1.5.1 Composição, estrutura e organização.....	6
1.5.2 Factores que influenciam o desenvolvimento de biofilmes.....	7
□ Propriedades físico-químicas.....	7
□ Parâmetros ambientais .....	8
1.5.3 Resistência a antimicrobianos.....	8
1.5.4 Etapas da formação do biofilme.....	10
1.5.5 Avaliação da capacidade de formação de biofilmes.....	11
1.6 Proteínas envolvidas no sistema de secreção.....	12
1.7 Proteínas flagelares .....	13
1.8 Exoproteínas .....	14
1.8.1 Proteína de ligação à parede celular (gene <i>Imo2504</i> ) .....	14
1.8.2 <i>Penicillin Binding Protein</i> (gene <i>Imo1438</i> ).....	15
1.9 Objectivos do presente trabalho .....	15
2. Materiais e Métodos.....	16
2.1. Estirpes utilizadas .....	16
2.2 Condições de crescimento .....	16
2.3. Meios de cultura .....	16
2.3.1 Meios líquidos.....	16
2.3.2 Meios Sólidos .....	18
2.3.3 Soluções.....	19
2.3.4 Soluções de antibióticos .....	20

2.4 Procedimento com vista à construção de um mutante de <i>Listeria monocytogenes</i> por recombinação homóloga .....	20
2.4.1 Obtenção de lisado de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	20
2.4.2 PCR .....	20
□ Primers utilizados .....	20
□ Mistura de amplificação .....	22
□ Condições de amplificação para os fragmentos A, B e AB e confirmação dos recombinantes .....	24
2.4.3 Electroforese.....	24
2.4.5 Extracção e purificação do plasmídeo pAUL-A .....	24
2.4.6 Obtenção do plasmídeo recombinante.....	25
2.4.7 Preparação de células competentes de <i>E.coli</i> .....	26
2.4.8 Preparação de células de <i>Listeria monocytogenes</i> para electroporação .....	26
2.5 Avaliação da capacidade de formação de biofilme: estirpe selvagem <i>versus</i> respectivo mutante .....	27
2.5.1 Construção de uma recta de calibração .....	27
2.5.2 Avaliação da capacidade de formação do biofilme pelo método do cristal violeta .....	28
2.5.3 Avaliação da capacidade de formação do biofilme pelo método do vermelho de ruténio.....	28
2.5.4 Avaliação da capacidade de formação do biofilme em aço inoxidável por enumeração das células .....	29
2.5.4.1 Optimização das condições de recuperação de biofilmes no método dos cupões de aço inoxidável .....	30
2.6 Análise estatística dos resultados.....	30
3. Resultados e Discussão.....	31
3.1 Ensaio preliminares.....	31
3.1.1 Recta de calibração .....	31
3.1.2 Optimização das condições de recuperação de biofilmes a partir de cupões de aço inoxidável .....	31

3.2 Procedimentos com vista à construção de um mutante de <i>Listeria monocytogenes</i> no gene <i>lmo1438</i> .....	32
3.2.1 Amplificação dos fragmentos A e B.....	32
3.2.2 Testes ao plasmídeo.....	34
3.2.3 Testes às enzimas de restrição e à ligase.....	35
3.3 Avaliação da capacidade de formação de mutantes de <i>L. monocytogenes</i> .....	37
3.3.1 Avaliação da capacidade de formação de biofilme em meio mínimo MWB.	37
3.3.2 Avaliação da capacidade de formação de biofilme em meio complexo TSB39	
4. Conclusões e perspectivas futuras .....	45
5. Bibliografia.....	46
6. Anexos.....	i

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Fisiopatogenia da infecção por <i>Listeria monocytogenes</i> (Vazquez-Boland <i>et al.</i> , 2001).....	4
<b>Figura 2</b> - Invasão celular promovida por <i>Listeria monocytogenes</i> (De las Heras <i>et al.</i> , 2011) .....	5
<b>Figura 3</b> - Representação gráfica da formação de um biofilme (Xavier <i>et al.</i> , 2004)...	11
<b>Figura 4</b> - Localização dos primers utilizados em relação ao gene <i>Imo1438</i> .....	21
<b>Figura 5</b> - Recta de calibração para <i>L. monocytogenes</i> CBISA 3119.....	31
<b>Figura 6</b> – Amplificação do fragmento A.....	32
<b>Figura 7</b> – Amplificação do fragmento B.....	33
<b>Figura 8</b> – Amplificação do fragmento AB .....	33
<b>Figura 9</b> Electroporação em gel de agarose do plasmídeo pAUL-a e de plasmídeos extraídos de colónias de <i>E. coli</i> resistentes à eritromicina .....	34
<b>Figura 10</b> - Comparação do plasmídeo pAUL-a intacto e possíveis plasmídeos recombinantes digeridos pela enzima BamHI .....	35
<b>Figura 11</b> - Teste à enzima de restrição Xba I e à ligase com o plasmídeo pAUL-a....	35
<b>Figura 12</b> - Teste à enzima de restrição BamHI com o plasmídeo pUC 18 .....	36
<b>Figura 13</b> - Avaliação da capacidade de formação de biofilme de <i>L. monocytogenes</i> em meio MWB .....	38
<b>Figura 14</b> - Avaliação da capacidade de formação de biofilme de <i>L. monocytogenes</i> em meio TSB.....	40

## Índice de Quadros

<b>Quadro 1</b> - Estirpes utilizadas no presente trabalho .....	16
<b>Quadro 2</b> - Constituição do meio MWB .....	18
<b>Quadro 3</b> - <i>Primers</i> utilizados e respectivas sequências .....	21
<b>Quadro 4</b> - Conjunto de primers utilizados e respectivo número de pares de bases do fragmento a amplificar .....	22
<b>Quadro 5</b> - Conjunto de primers utilizados para amplificar respectivamente o fragmento A, B e AB e respectivo número de pares de base do fragmento a amplificar .....	22
<b>Quadro 6</b> - Composição da mistura de amplificação para o fragmento A e B.....	23
<b>Quadro 7</b> - Composição da mistura de amplificação para o fragmento AB.....	23
<b>Quadro 8</b> - Mistura de amplificação para confirmação dos transformantes .....	23
<b>Quadro 9</b> - Condições de PCR.....	24
<b>Quadro 10</b> - Componentes e respectivos volumes utilizados para a digestão com a enzima de restrição Xba I .....	25
<b>Quadro 11</b> - Componentes e respectivos volumes utilizados para a digestão com a enzima de restrição BamH I.....	25
<b>Quadro 12</b> - Componentes e respectivos volumes utilizados para a recção de ligação .....	26
<b>Quadro 13</b> - Valores médios UFC/cm <sup>2</sup> obtidos para os diferentes tempos de sonicação testados.....	32

## **Simbologia e Abreviaturas**

**CBD** – Calgary Biofilm Device

**CBISA** – Colecção de Bactérias do Instituto Superior de Agronomia

**EFSA** – *European Food Safety Authority*

**LLO** – Listeriolisina O

**InIA** – Internalina A

**InIB** – Internalina B

**PBP** – *Penicillin Binding Proteins*

**PCR** – *Polimerase Chain Reaction* – Reação em cadeia da polimerase

**PEC** – Polímeros Extra Celulares

**SEM** – *Scanning Electron Microscopy*

**Tat** – *Twin-arginine translocation*

**TEM** – *Transmission Electron Microscopy*

**UFC** – Unidade Formadora de Colónia

## 1. Introdução

### 1.1 Características gerais de *Listeria monocytogenes*

A identificação de *Listeria monocytogenes* data de 1924 quando esta foi isolada como agente de doença septicémica afectando coelhos e porquinhos-da-Índia em Cambridge, Inglaterra (Vásquez-Boland *et al.*, 2001, Berzins *et al.*, 2010).

O género *Listeria* pertence ao reino *Bacteria*, filos *Firmicutes*, classe *Bacili*, ordem *Bacillales* e família *Listeriaceae* (Berzins *et al.*, 2010). Este consiste num grupo de bactérias gram positivas de baixo conteúdo em G+C ( $\pm 38\%$ ) (Weinmaier *et al.*, 2013) relacionando-se desta forma com os géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Stafilococcus* (Vasquez-Boland *et al.*, 2001). O género *Listeria* inclui, actualmente, quinze espécies, seis das quais inicialmente identificadas: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. seeligeri* e *L. grayi* (Vasquez-Boland *et al.*, 2001). Em 2010 foram descritas mais duas espécies: *L. marthii* (Graves *et al.*, 2010), e *L. rocourtii* (Leqlercq *et al.*, 2010). Em 2012 outras duas espécies: *L. weihenstephanensis* (Halter *et al.*, 2013) e *L. fleischmannii* (Bertsch *et al.*, 2013). Já no ano de 2014, Bakker *et al.* descreveram cinco novas espécies, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia* e *L. grandensis*.

Este género é caracterizado por bactérias anaeróbias facultativas não esporuladas. Não possui cápsula e apresenta mobilidade no intervalo de temperaturas de 10 °C até 25 °C (Vásquez-Boland *et al.*, 2001).

São bactérias catalase-positiva e oxidase negativa. Morfologicamente tem a forma de bastonete, curto, com um diâmetro de cerca de 0,5 µm e um comprimento entre 0,5 µm e 2,0 µm.

Uma variedade de métodos têm vindo a ser utilizados para discriminar *L. monocytogenes*. Um dos primeiros métodos remonta ao ano de 1979. Seeliger e Hohne desenvolveram um método de aglutinação baseado nas reacções dos antígenos somáticos (O) e flagelares (H) para serotipagem de *Listeria*. No entanto, este método é descrito como sendo demorado e pouco sensível, pelo que novas técnicas têm vindo a ser desenvolvidas (Nadon *et al.*, 2001). Palumbo *et al.* (2003) desenvolveram um ensaio que denominaram ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) em alternativa aos ensaios de aglutinação tradicionais, provando ser um método mais eficiente do que este.

No ano de 2004, Doumith *et al.* propuseram um método de serotipagem baseado na reacção de PCR. A técnica tem como alvo cinco genes: *Imo0737*, *Imo1118*, *ORF2819*, *ORF2110* e *prs* permitindo assim separar os isolados da espécie em quatro serogrupos distintos. Esta técnica requer uma optimização no ajuste das concentrações de *primers*, bem como das concentrações dos dNTP's e de Mg<sup>2+</sup>. No entanto, uma vez conseguida esta

optimização o multiplex PCR é considerada uma técnica sensível e selectiva. Num estudo mais recente, Vitullo *et al.* (2013) descreveram a utilização de um ensaio de PCR em tempo real para serotipagem de *L. monocytogenes* de forma a diferenciá-la de outras espécies de *Listeria*. Este método é descrito pelos autores como preciso e rápido.

Estão descritos 13 serotipos de *L. monocytogenes*: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, e 7) (Nadon *et al.*, 2001, Motarjemi *et al.*, 2014).

*L. monocytogenes* pode ser isolada de entre uma diversidade de fontes ambientais, incluindo: solo, água, efluentes, pastagens e de fezes humanas e animais. Este microrganismo tem a capacidade de crescer numa grande variedade de alimentos. Pensa-se que o habitat natural desta bactéria seja matéria vegetal em decomposição, onde vive como saprófita (Vasquez-Boland *et al.*, 2001).

## **1.2 Factores que afectam a sobrevivência e o crescimento de *Listeria monocytogenes***

A habilidade desta bactéria para crescer em condições consideradas adversas tornam-na num patógeno alimentar difícil de erradicar (Carpentier *et al.*, 2011). Esta bactéria consegue encontrar condições de crescimento em ambiente de indústrias alimentares, tendo já sido isolado, de queijo e de leite (Hayes *et al.*, 1998; Leite *et al.*, 2006), produtos cárneos (Peccio *et al.*, 2003) e produtos piscícolas (Nakamura *et al.*, 2004).

*L. monocytogenes* tem a capacidade de crescer num intervalo de temperaturas de 1,5 a 45 °C, com um óptimo de 30 a 37 °C não sendo no entanto considerado um organismo resistente ao calor. No leite é eliminado por uma pasteurização convencional. A sua habilidade de sobreviver e crescer a temperaturas de refrigeração (2 °C a 4 °C) é um dos factores que torna tão difícil o controlo deste patógeno alimentar (Gandhi *et al.*, 2006).

No que diz respeito ao pH, *L. monocytogenes* cresce num intervalo de pH entre 4,3 e 9,6 com um óptimo entre 6 e 8. No entanto, estes valores podem variar com o acidulante utilizado e com a temperatura. Quando inoculada em sumo de laranja ou em morangos cortados (pH 3,6 – 3,8), foram observadas reduções logarítmicas de 0,5 a 1 UFC no armazenamento durante 7 dias a 4 °C. Por outro lado, reduções logarítmicas de 4 a 5 UFC foram observadas, até 5 dias, quando o sumo de laranja foi incubado a 30 °C (Gandhi *et al.*, 2007; Motarjemi *et al.*, 2014).

O crescimento de *L. monocytogenes* é também afectado pela actividade da água ( $a_w$ ).

Em condições óptimas de pH e de temperatura, o valor mínimo de actividade da água que permite o crescimento é de 0,90. No entanto, esta bactéria já foi recuperada a partir de salmouras com uma actividade da água de 0,75 (temperaturas de 14 °C a 16 °C), por um longo período de tempo, evidenciando assim resistência a valores de actividade da água bastante baixos (Motarjemi *et al.*, 2014).



Em relação ao oxigénio, *L. monocytogenes* pode ser classificada como uma bactéria anaeróbia facultativa, pelo que o crescimento ocorre em condições anaeróbicas, mas é potenciado em condições aeróbicas. Para concentrações de CO<sub>2</sub> acima de 50% verifica-se inibição de crescimento (Motarjemi *et al.*, 2014).

É geralmente assumido que *L. monocytogenes* exibe resistência à radiação UV e aos raios gama, de modo semelhante a outras bactérias gram-positivas apresentando no entanto, uma resistência maior, quando comparada com bactérias gram-negativas (Motarjemi *et al.*, 2014).

### **1.3 Listeriose e factores de virulência**

*L. monocytogenes* é o agente causal da doença designada por listeriose. Esta doença apresenta uma taxa de mortalidade de cerca de 20%. Na União Europeia em 2012, foram reportados 1642 casos confirmados de listeriose, um aumento de 10,5 % em relação a 2011, cujo número de casos confirmados foi de 1486 (EFSA, 2014). O estabelecimento desta doença depende de três variáveis: o número de bactérias ingeridas com os alimentos, a virulência da estirpe e o estado imunológico do hospedeiro (Motarjemi *et al.*, 2014). Em humanos, a listeriose é provocada pelo consumo de alimentos contaminados, estando associada principalmente ao consumo de produtos piscícolas, produtos cárneos, leite e queijo (ESFA, 2014).

Também a listeriose animal é considerada uma zoonose relevante, e a redução da sua incidência exige a prevenção, nomeadamente a monitorização do estado de saúde dos animais. Esta monitorização pode ser realizada de um modo precoce utilizando ensaios ELISA tendo como alvo a proteína LLO, factor de virulência produzido pelas estirpes de *L. monocytogenes* (Shoukat *et al.*, 2013).

*L. monocytogenes* é um parasita intracelular. Após a ingestão de alimentos contaminados, a bactéria é capaz de atravessar o epitélio intestinal e disseminar-se através da linfa e corrente sanguínea para os tecidos mais profundos. O fígado e o baço são os principais órgãos visados para posterior multiplicação bacteriana. Uma das principais características de *L. monocytogenes* é a sua capacidade de atravessar grandes barreiras epiteliais, como a barreira hemato-encefálica levando a meningo-encefalites e a barreira placentária levando a infecções do feto, podendo causar eventualmente, aborto, morte fetal ou meningite neonatal (Cousens *et al.*, 2000; Vazqu  ez-Boland *et al.*, 2001; Lecuit, 2007). Em indivíduos imunocompetentes, sem qualquer condição predisponente, a ingestão de um pequeno número de *L. monocytogenes*, provavelmente, apenas provocar   desenvolvimento de imunidade do hospedeiro. A ingestão de elevadas quantidades poderá resultar num episódio de gastroenterite e febre e, dependendo da virulência da estirpe, numa situação invasiva. Os jovens, idosos, grávidas e pessoas com o sistema imunitário comprometido apresentam

uma susceptibilidade mais elevada a esta doença, não conseguindo estabelecer uma resposta imunitária adequada e suficiente para controlar a multiplicação hepática, podendo levar à invasão de outros tecidos, através da corrente sanguínea, mesmo no caso de ingestão em doses baixas (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Na **figura 1** é possível observar a fisiopatogenia da infecção por *L. monocytogenes*.

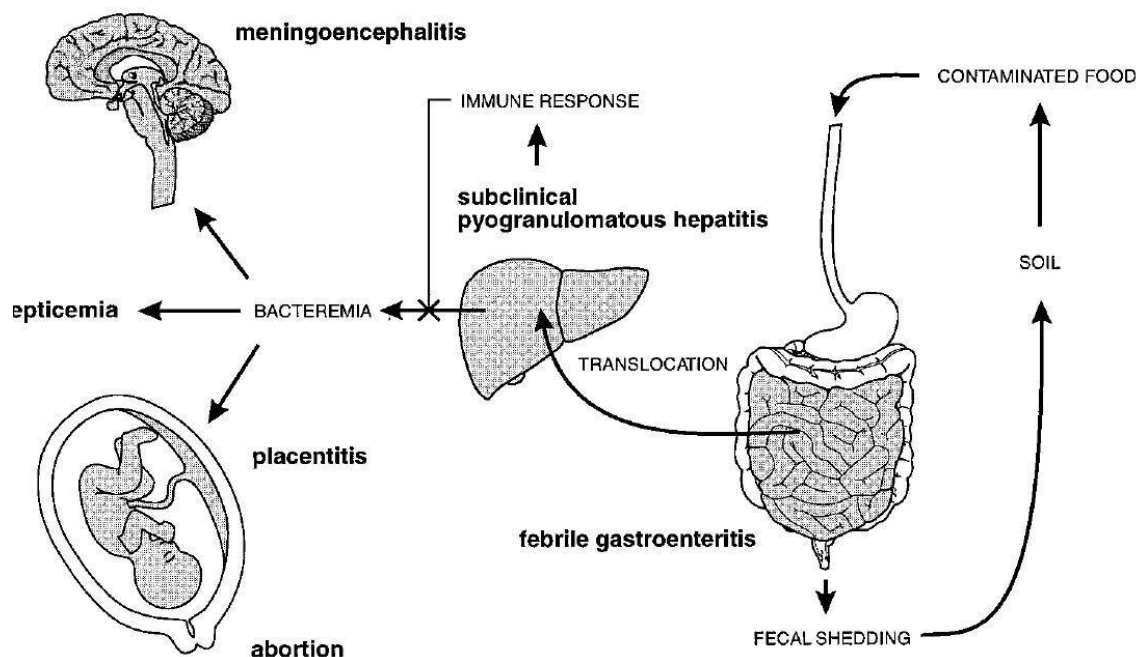


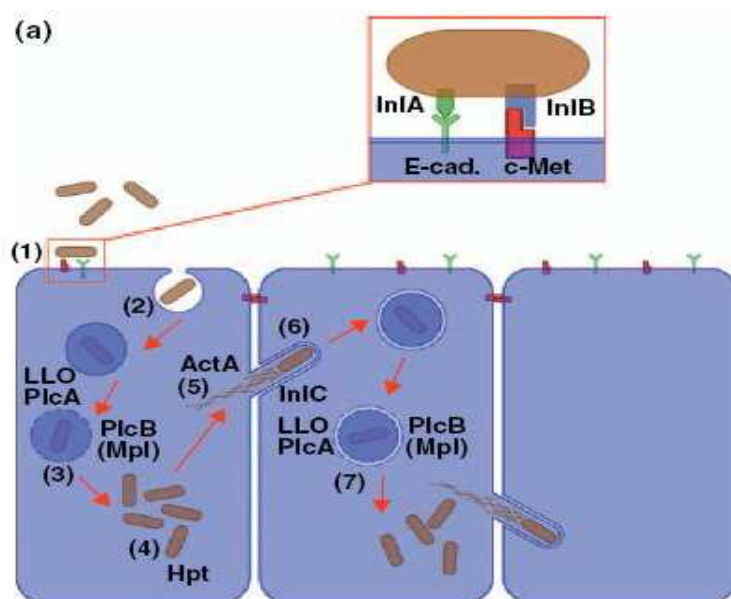
Figura 1 - Fisiopatogenia da infecção por *Listeria monocytogenes* (Vázquez-Boland *et al.*, 2001)

A dose infecciosa ainda não foi determinada em humanos mas o número de bactérias detectadas nos alimentos responsáveis por surtos e por casos esporádicos, sugere que seja cerca de  $10^6$  células. Apenas quatro dos 13 serotipos existentes (1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b) estão envolvidos na maioria dos casos reportados de listeriose em humanos (Renier *et al.*, 2011; Motarjemi *et al.*, 2014).

Os genes de virulência de *L. monocytogenes*, assim como de outras espécies patogénicas deste género, estão organizados, na maior parte, em ilhas de patogenicidade (PAIs). PAIs são normalmente adquiridas pela bactéria via transferência horizontal, por vezes como parte de elementos genéticos móveis e que, consequentemente, têm um papel chave na evolução da virulência bacteriana (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Já foram identificadas duas ilhas de patogenicidade em *Listeria*, a ilha de patogenicidade 1 (LIPI-1) e a ilha de patogenicidade 2 (LIPI-2) (Vázquez-Boland *et al.*, 2001; Hain *et al.*, 2006;). Existem várias proteínas responsáveis pela patogénese de *L. monocytogenes*. Algumas são responsáveis pela aderência e invasão da célula hospedeira, como a Internalina A (InlA) e a Internalina B (InlB)

e outras pelo ciclo de infecção intracelular, tais como a Listeriolisina O (LLO), Fosfolipase C e ActA (Kuhn *et al.*, 2008). A Internalina A é uma proteína que promove a entrada nas células hospedeiras quando se liga ao receptor E-caderina presente nas células do epitélio intestinal humano (Liu *et al.*, 2007; Motarjemi *et al.*, 2014). A Internalina B é também fundamental para a invasão de *L. monocytogenes*, exibindo contudo uma gama mais ampla de receptores que a Internalina A (Liu *et al.*, 2007). A saída do patógeno do vacúolo, dentro das células infectadas requer a expressão da Listeriolisina O, uma toxina que forma poros induzindo a lise deste compartimento (Vasquez-Boland *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2007; Motarjemi *et al.*, 2014). Encontrando-se o fagossoma lisado, as bactérias são libertadas no citoplasma. Este movimento intracelular requer a expressão de uma proteína de superfície denominada ActA. Esta proteína é requerida para a polimerização de filamentos de actina que permitem que *L. monocytogenes* se mova de uma célula infectada, para outra célula adjacente, sem estar exposta ao ambiente extracelular (Vasquez-Boland *et al.*, 2001, Motarjemi *et al.*, 2014). Na **figura 2** é possível observar a representação da invasão celular promovida por *L. monocytogenes*, bem como os factores de virulência.

Figura 2 - Invasão celular promovida por *Listeria monocytogenes* (De las Heras *et al.*, 2011)



#### **1.4 Impacto de *Listeria monocytogenes* na indústria alimentar**

A habilidade de adaptação e sobrevivência de *L. monocytogenes* em condições consideradas extremas, quando comparada com outros patógenos, faz desta bactéria um desafio considerável em termos de erradicação e controlo em ambiente de processamento de alimentos e uma grande preocupação para a indústria alimentar (Motarjemi *et al.*, 2014). Vários estudos (Renier *et al.*, 2011; Pilchová *et al.*, 2014) indicam que a fonte mais importante de contaminação de alimentos é a contaminação cruzada de equipamentos e do ambiente em geral, após os alimentos terem sido processados (Motarjemi *et al.*, 2014).

A descoberta de que, estirpes persistentes são frequentemente recuperadas do equipamento e superfícies após limpeza e desinfecção enfatiza o risco de crescimento e estabelecimento de *L. monocytogenes* particularmente em locais de difícil acesso, levando à contaminação dos produtos alimentares (Motarjemi *et al.*, 2014). Esta sua capacidade de persistência leva a que a indústria necessite de implementar esforços no que concerne à higienização. É importante perceber as zonas de alto e baixo risco e criar um plano sistemático de higienização bem como um plano sistemático de inspeções e de amostragem.

Tem sido demonstrada a capacidade de *L. monocytogenes* de aderir a diferentes tipos de superfícies em indústrias alimentares tais como, borracha, ferro fundido, aço inoxidável, nylon, teflons, poliéster e vidro. (Bower *et al.*, 1999; Eirini *et al.*, 2011; Ibusquiza *et al.*, 2011). Alguns estudos têm fornecido fortes evidências da capacidade deste patógeno para formar biofilmes, constituindo uma barreira para os desinfetantes.

#### **1.5 Biofilmes bacterianos**

##### **1.5.1 Composição, estrutura e organização**

De acordo com Donlan *et al.* (2002), biofilme pode ser definido como uma comunidade microbiana séssil caracterizada por células irreversivelmente aderentes a um substrato ou entre elas, embebidas numa matriz de polímeros extracelulares (PEC) por elas produzidos e que apresentam alterações fenotípicas no que respeita a taxas de crescimento e expressão génica.

A formação de biofilme permite a colonização de vários tipos de superfícies e interfaces.

Após adsorção, em condições de abundância de nutrientes, é desencadeada a produção de exopolissacáridos, o que permite não só a acumulação de nutrientes, mas também a aderência das células num ambiente cujas condições são propícias ao crescimento.

A existência das bactérias em biofilme possibilita a actuação em comunidade das células que o constituem. As células ao crescerem em biofilme apresentam heterogeneidade fenotípica, o que pode ser interpretado como especialização e divisão de funções, à semelhança do que se verifica nos organismos multicelulares (Srey *et al.*, 2013). Os

microrganismos no interior do biofilme libertam moléculas sinalizadoras designadas de auto indutoras, que se vão acumulando no meio, à medida que a população cresce e a sua densidade aumenta. Quando são atingidos níveis críticos destas moléculas, são induzidas alterações na expressão dos genes bacterianos (Bassler *et al.*, 2002). Este fenómeno designa-se por quorum sensing. No que diz respeito às bactérias gram-positivas, as moléculas auto-indutoras são, geralmente, pequenos péptidos modificados que são enviados para o exterior da célula através de transporte activo. Estas moléculas interagem com a membrana celular por via das proteínas da membrana. Verifica-se então uma cascata de fosforilações que culmina na activação por estas proteínas da transcrição dos genes alvo. Estes péptidos podem também conduzir à lise de uma parte da população. A libertação de DNA por via de lise bacteriana constitui uma parte importante dos PEC dos biofilmes sendo ainda relevante como mecanismo de transferência horizontal de genes em células naturalmente competentes (Matsukawa *et al.*, 2004).

### **1.5.2 Factores que influenciam o desenvolvimento de biofilmes**

A formação e desenvolvimento de biofilmes são afectados por propriedades físico-químicas e parâmetros ambientais.

- **Propriedades físico-químicas**

Os biofilmes em natureza são geralmente constituídos por várias espécies. Estes biofilmes são geralmente de dimensões superiores e mais estáveis do que os biofilmes de uma única espécie. Vários estudos sugerem que a associação de *L. monocytogenes* com outros géneros bacterianos favorece a colonização de superfícies (Srey *et al.*, 2013).

A microbiota existente numa unidade industrial pode, no entanto, ter um impacto negativo no desenvolvimento de biofilmes de *L. monocytogenes*, pelo que a existência de microrganismos inibidores poderá explicar a não contaminação de determinadas unidades industriais. No estudo de Zhao *et al.* (2004), foram identificadas duas bactérias (*Enterococcus durans* e *Lactococcus lactis*) com potencial para controlar os biofilmes de *L. monocytogenes*.

As bactérias possuem carga negativa na superfície e geralmente comportam-se como hidrofóbicas, no entanto o grau de hidrofobicidade pode variar com a fase de crescimento (Chmielewski *et al.*, 2003). *Listeria* exhibe um aumento de aderência na fase de maior actividade metabólica. Para esta bactéria as condições óptimas de actividade metabólica e de aderência são a pH 7 e temperatura de 30 °C As estruturas que se projectam a partir da membrana celular, tais como, lipolissacáridos (LPS), adesinas e outras proteínas, bem como, ácidos lipoteicóicos podem desempenhar um papel importante na aderência microbiana. *L. monocytogenes* pode utilizar flagelos, *pili* e proteínas membranares para iniciar a aderência. A perda destes apêndices celulares altera as propriedades da superfície,

o que pode levar a uma perda de capacidade de aderência em algumas superfícies (Chmielewski *et al.*, 2003).

- **Parâmetros ambientais**

A concentração dos nutrientes presentes no meio é um factor que influencia a formação de biofilmes. A maioria dos estudos indica a preferência de *L. monocytogenes* para formar biofilmes em condições de abundância nutritiva. Stepanovic *et al.* (2004) verificaram um maior crescimento de biofilme de *L. monocytogenes* em meio TSB do que em meio TSB diluído (1/20).

Também as características das superfícies influenciam a ligação inicial das células. Vários materiais como o vidro, aço inoxidável e PVC são utilizados no processamento de alimentos sendo que, *L. monocytogenes* possui a capacidade de aderir e colonizar estas superfícies, formando biofilmes. Bonsaglia *et al.* (2014) estudaram a capacidade da *L. monocytogenes* para formar biofilmes em diferentes tipos de superfícies: superfícies hidrofóbicas (polistireno) e superfícies hidrofílicas (vidro e aço inoxidável). Observaram que a percentagem mais elevada de formação de biofilme ocorreu em superfícies hidrofílicas, independentemente da temperatura testada. Em 2008, Bonaventura e colaboradores tinham observado um crescimento mais elevado em vidro a temperaturas de 4, 12 e 22 °C comparando com superfícies de polistireno. Observaram também que ocorre um decréscimo da produção de biofilme a 35 °C em aço inoxidável. Também Chavant *et al.* (2002) verificaram esta diminuição. Estes autores explicam o decréscimo com o possível desprendimento das células antes de uma nova fase de colonização. De um modo geral, assume-se que a aderência das bactérias é realizada preferencialmente a superfícies rugosas e desgastadas que, ao acumularem água e nutrientes, proporcionam nichos ideais para o desenvolvimento bacteriano. No entanto Tide *et al.* (1999), não verificaram diferença na aderência inicial de *L. monocytogenes* a aço inox polido ou não polido.

### **1.5.3 Resistência a antimicrobianos**

As células que constituem o biofilme são mais resistentes aos agentes antimicrobianos do que as células planctónicas, uma vez que os biofilmes constituem uma barreira que previne ou diminui o contacto com os agentes antimicrobianos (Chmielewski *et al.*, 2003; Eirini *et al.*, 2011; Srey *et al.*, 2013). Este facto teria sido já verificado por Bower *et al.* (1996), que demonstraram que ocorre uma lenta difusão dos biocidas no interior do biofilme. As células bacterianas que se encontram profundamente embebidas no biofilme recebem menos oxigénio e menos nutrientes do que as células em suspensão. Em resposta a esta condição de privação, as células apresentam alterações fisiológicas, incluindo um decréscimo na taxa de crescimento e, consequentemente, uma menor susceptibilidade aos agentes

antimicrobianos. A expressão alterada dos genes de resistência é também apontada como razão para a verificação da menor susceptibilidade dos biofilmes (Mah *et al.*, 2001).

Assim, é necessário garantir que os programas de higienização utilizados assegurem acções mecânicas e químicas eficazes e que as temperaturas e tempos de contacto com os produtos sanificantes permitam uma acção antimicrobiana adequada, pois a ocorrência de biofilmes nas indústrias alimentares pode originar problemas de higiene e saúde pública, bem como, perdas de eficiência nos permutadores de calor, perda de cargas nas tubagens e uma aceleração na deterioração de materiais (Wirtanen *et al.*, 2003; Lubber *et al.*, 2011).

A principal forma de combater os biofilmes na indústria alimentar, é com a utilização de desinfectantes, sendo designados genericamente por agentes biocidas. A resposta dos microrganismos aos agentes biocidas tem sido amplamente estudada devido aos fenómenos de resistência e persistência que se têm vindo a verificar, tanto em contexto industrial, como em contexto clínico.

Cruz *et al.* (2012), confirmaram que a inactivação de *L. monocytogenes* em biofilme é mais difícil do que em células planctónicas. Estes autores verificaram que os desinfectantes testados resultaram numa redução de 5 log de células em suspensão, a concentrações inferiores às recomendadas pelos fabricantes. Quando testados em biofilme, apenas o ácido peracético e o dióxido de cloro apresentaram uma redução de 5 log com concentrações próximas das recomendadas pelos fabricantes.

Tendo em conta que os agentes desinfectantes não têm tido muito sucesso na eliminação de *L. monocytogenes* na forma de biofilme, em ambientes de processamento de alimentos, novos métodos têm vindo a ser desenvolvidos para controlar este e outros patógenos problemáticos. Ferreira *et al.* (2013) desenvolveram micropartículas de carbonato de cálcio que agem como portadoras de moléculas biocidas, fixando-se à superfície do biofilme. Conseguem transportar desta forma, o agente biocida para os locais desejados. Estas partículas mostraram inactivação entre 81,9 e 93,3% da totalidade da população. Para além do sucesso em termos de inactivação, apresentam também a vantagem de serem micropartículas baratas, porosas e abundantes na natureza. No entanto ainda só foram testadas contra biofilmes de *Pseudomonas fluorescens*.

Já em 2014, Shobitz *et al.* testaram um novo método desta vez contra biofilmes de *L. monocytogenes*. Os autores formularam um biocontrolador que consiste num fermentado, tratado termicamente, de estirpes de *Carnobacterium maltaromaticum* e *Enterococcus mundtii* e nisina numa concentração de 1000 UI/mL. Este biocontrolador conseguiu uma redução das contagens de 3,2 log UFC/cm<sup>2</sup> para <1,0 log UFC/cm<sup>2</sup>, após 24 horas de contacto, a 4 °C.

#### 1.5.4 Etapas da formação do biofilme

A formação do biofilme é um processo dinâmico que pode ser dividido em quatro etapas: aderência inicial, aderência irreversível, desenvolvimento inicial da arquitectura do biofilme e maturação (Srey et al. 2013).

A aderência inicial consiste na aderência da célula a uma superfície e depende fortemente das propriedades físico-químicas da superfície e da célula bacteriana (Ferreira *et al.*, 2013), mas também da composição do meio envolvente (Chmielewski *et al.*, 2003). Em primeiro lugar, as células aderentes, as que originam a formação de biofilme sobre uma superfície, possuem apenas uma pequena quantidade de polímeros extra celulares (PEC) e muitas são capazes de movimento mediadas por *pilus*, deslizando ou através de contracções celulares. Nesta fase, a aderência é reversível, uma vez que os microrganismos aderidos ainda não estão comprometidos com o processo de diferenciação (série de mudanças morfológicas) que levam à formação de biofilme e muitas das células podem separar-se da superfície e voltar ao estilo de vida planctónico (Srey *et al.*, 2013). Esta aderência é mediada por interacções não específicas, como interacções hidrofóbicas para superfícies abiotas, ou através de ligações moleculares específicas para tecidos vivos ou desvitalizados (Kumar *et al.*, 1998).

Na etapa de aderência irreversível, uma mudança de uma ligação reversível para uma ligação irreversível ocorre através da mudança de uma interacção fraca das bactérias com a superfície, para uma ligação permanente com a presença de PEC (Stoodley *et al.*, 2002). Os PEC ao complexarem-se com os materiais de superfície e/ou com os receptores específicos localizados em *pilis*, consolidam a aderência dos microrganismos (Kumar *et al.*, 1998). Estes polímeros extracelulares, além de criarem uma estrutura tridimensional que protege as bactérias, também fornecem um sistema de canais que armazena os nutrientes e minerais necessários para a sua sobrevivência. Nesta fase, estão envolvidas forças como as de interacção dipólo-dipólo, pontes de hidrogénio, ligações iónicas, ligações covalentes e interacções hidrofóbicas (Kumar *et al.*, 1998). Após esta fixação, para remoção do biofilme são necessárias forças de cisalhamento fortes ou quebra química por enzimas, detergentes, desinfetantes e/ou calor (Srey *et al.*, 2013).

No desenvolvimento inicial da arquitectura do biofilme, a formação de microcolónias resulta da acumulação e do crescimento simultâneo de microrganismos e encontra-se associada à produção de PEC (Chmielewski *et al.*, 2003), o que ajuda a fortalecer a ligação entre as bactérias e o substrato e estabiliza a colónia de qualquer stresse ambiental (Srey *et al.*, 2013). Esta agregação pode envolver o recrutamento de células planctónicas a partir do meio circundante como resultado da comunicação célula-a-célula (*quorum sensing*).

A maturação do biofilme consiste no crescimento e aglomeração suficiente do biofilme, se as condições forem adequadas. O biofilme pode, desta forma, desenvolver uma estrutura



organizada. O biofilme maduro consiste numa única camada de células em polímero extracelular poroso ou em multicamadas que envolvem as microcolónias em conjunto com PEC e intercaladas com canais de água (Chmielewski *et al.*, 2003). Ao se multiplicarem e morrerem, as bactérias e o PEC por elas produzidos interagem com moléculas orgânicas e inorgânicas criando a matriz ou glicocalix.

O crescimento do biofilme não é ilimitado, podendo ser limitado por factores como a disponibilidade de nutrientes para as células do interior ou pela acumulação de metabolitos tóxicos. A **figura 3** representa a formação de um biofilme.

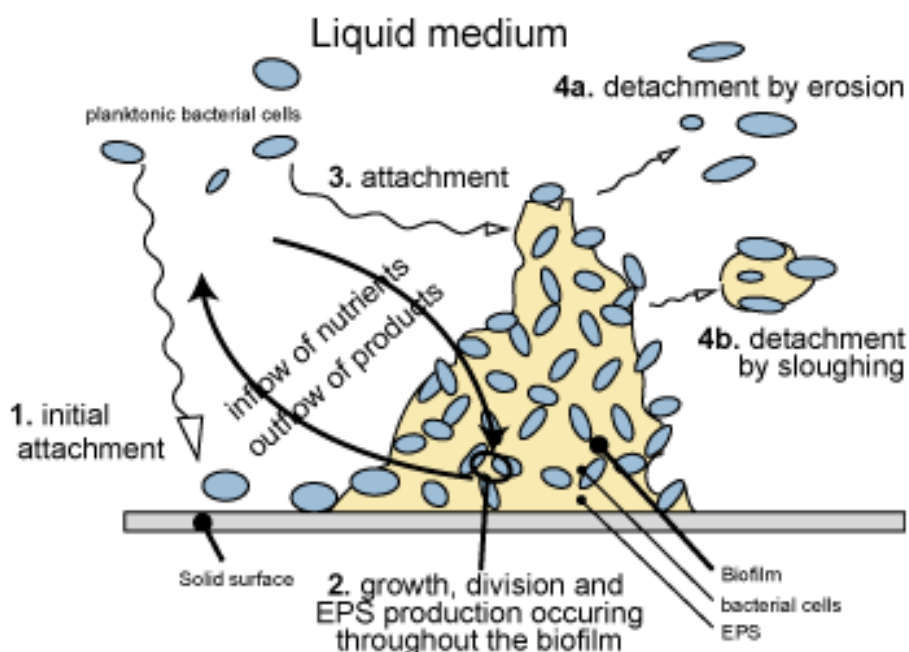


Figura 3 - Representação gráfica da formação de um biofilme (Xavier *et al.*, 2004)

### 1.5.5 Avaliação da capacidade de formação de biofilmes

As metodologias utilizadas para a avaliação da capacidade de formação de biofilme por parte das bactérias são variadas. O método do cristal violeta proposto por Christensen *et al.* (1985) tem sido amplamente utilizado e envolve o crescimento de biofilmes em microplacas, coloração com cristal violeta e, de seguida, solubilização do corante ligado e medição da sua absorvância. Este método tem como alvo as células do biofilme.

Também o método do vermelho de ruténio permite avaliar a capacidade de formação do biofilme. No entanto, neste o alvo são os exopolissacáridos da matriz do biofilme.

Os métodos que se baseiam na coloração para quantificar o biofilme têm como principal vantagem não possuírem a operação de dissociação das células do biofilme. Desta forma são evitados os erros na quantificação, por defeito, resultantes da má dissociação do biofilme (Pettit *et al.*, 2005).

Outros métodos de medição de biofilmes pressupõem a remoção das células da superfície e a inoculação da suspensão de células resultantes para determinar o número de unidades formadoras de colónias (UFC). O aço inoxidável é frequentemente utilizado para o crescimento dos biofilmes. Os investigadores têm utilizado diversas técnicas para retirar as células da superfície incluindo: ultra-sons, agitação em vórtex, raspagem e utilização de zaragatoa.

O método *Calgary Biofilm Device* (CBD) é utilizado para avaliação da susceptibilidade de biofilmes a agentes antimicrobianos. Utiliza microplacas de 96 poços cuja tampa apresenta protuberâncias de poliestireno (pregos) cada um com uma área média de 108,9 mm. Os 96 pregos idênticos ficam em contacto com o meio de cultura, durante a incubação num agitador orbital permitindo assim o desenvolvimento do biofilme. O biofilme pode ser então sujeito a testes com agentes antimicrobianos e quantificado após remoção através de sonicação (Ceri *et al.*, 1999).

No que concerne à visualização dos biofilmes, existem também diversas técnicas de microscopia, desde microscopia de contraste, microscopia de epifluorescência, microscopia de transmissão (TEM) e microscopia electrónica de varrimento (SEM) (Donlan *et al.*, 2002).

Uma avaliação mais fiável da capacidade de produção de biofilmes obtém-se quando existe concordância entre os resultados das diferentes técnicas utilizadas. (Lourenço *et al.* 2013).

### **1.6 Proteínas envolvidas no sistema de secreção**

Em bactérias gram-positivas, actualmente são conhecidos sete sistemas de secreção: o sistema Sec (secreção), o sistema Tat (*Twin-arginine translocation*), o sistema FPE (*Fimbrilin-Protein Exporter*), alguns exportadores de proteína ABC (*ATP-binding cassette*), o sistema FEA (*Flagellum Export Apparatus*), *holins* (*hole forming*) e o sistema Wss (sistema de secreção WXG 100) (Berks *et al.* 2000).

O sistema Tat é conhecido por segregar proteínas na fase final da sua conformação. Em bactérias gram-negativas, onde este sistema foi primeiramente identificado em procaríotas, a translocação através de Tat requer três proteínas da membrana, TatA, TatB e TatC, e todas foram demonstradas como sendo essenciais para a translocação de proteínas.

As bactérias gram-positivas possuem um sistema Tat mais simples, apenas com os genes *tatA* e *tatC* presentes. A função do gene ausente *tatB* é realizada por um componente *tatA* bifuncional. Em *L. monocytogenes* EGDe (serovar 1/2a) foi identificada apenas uma cópia dos genes que codificam para *tatA* e *tatC*, enquanto que, no serovar 4b não foram identificados genes que codificam para o sistema Tat. As duas proteínas que constituem o sistema Tat estão codificadas nos genes *lmo0361* e *lmo0362* (Robinson *et al.*, 2011) e parecem estar relacionadas com o gene *lmo0367* (uma peroxidase dependente de ferro),

uma vez que os dois primeiros codificam o sistema de translocação responsável pela secreção do segundo. Esta proteína faz parte de um operão formado pelos genes *lmo0365*, *lmo0366* e *lmo0367*, todos eles relacionados com o ferro. Entre estes dois *locus* mencionados existe um gene que codifica para uma peptidase (*lmo0363*) e um regulador transcripcional (*lmo0364*) (Ledala *et al.*, 2010). Na **figura 4** é possível observar a organização dos genes que codificam para o sistema Tat e o operão *lmo0365-7* em *Listeria monocytogenes* EGDe.

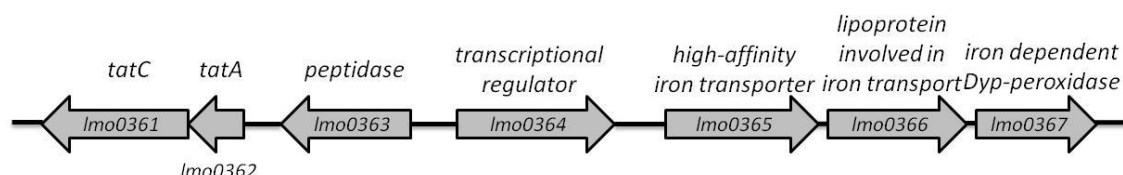


Figura 4 - Organização dos genes que codificam para o sistema Tat e o operão *lmo0365-7* em *L. monocytogenes* EGDe (Machado *et al.*, 2013).

Machado *et al.*, 2013 construíram um mutante EGDe com deleção nos dois genes que codificam o sistema Tat (*tatA* e *tatC*). Neste trabalho, foi possível verificar que o sistema Tat não é essencial para a sobrevivência de *L.monocytogenes*, uma vez que, o mutante, tal como a estirpe selvagem, apresentaram capacidade de crescimento tanto em meio completo, como em meio mínimo. No entanto, aquando da realização de testes de virulência, estes autores, verificaram que *in vivo*, a estirpe mutante era significativamente mais virulenta que a estirpe selvagem, indicando que o sistema Tat e, possivelmente a peroxidase, em vez de serem úteis e necessários para a virulência, podem comprometer a mesma.

Como referido anteriormente, o gene *lmo0364* codifica um regulador transcripcional, que se encontra a montante do operão *lmo0365-7*, tendo ainda sido pouco estudado. Machado *et al.* (2013) construíram um mutante com deleção no gene *lmo0364*, concluindo que a ausência desta gene não influencia o crescimento, nem a virulência de *L.monocytogenes*.

### 1.7 Proteínas flagelares

No que concerne aos flagelos bacterianos, estes podem ser subdivididos em cinco partes: o motor dos flagelos, o corpo basal, as proteínas de junção, os filamentos flagelares e o sistema FEA. O gene *lmo0716* codifica uma proteína semelhante a uma ATPase (FliI), e o gene *lmo0713* codifica o FliF, um componente flagelar do corpo basal. Em *L. monocytogenes*, a expressão dos flagelos é dependente da temperatura. São expressos menos flagelos a 37 °C do que a 20 °C. Este facto sugere que os genes da mobilidade

podem ser desregulados a 37 °C pelo activador transcripcional dos genes de virulência PrfA. Foi também recentemente demonstrado que a mobilidade flagelar em *L.monocytogenes* EGDe é regulada por MogR (repressor da mobilidade), um repressor transcripcional também requerido para a virulência bacteriana, assim como o regulador de resposta DegU (*Degradative Enzyme U*) (Desvaux *et al.*, 2005). Para além da mobilidade, estes flagelos também parecem desempenhar um papel na fixação celular inicial e subsequente formação de biofilme (Lemon *et al.*, 2007), bem como, na aderência à célula hospedeira e virulência bacteriana (Desvaux *et al.*, 2005).

## **1.8 Exoproteínas**

A capacidade de formação de biofilmes por parte de *L. monocytogenes* levou a que diversos investigadores estudassem as proteínas associadas à formação do biofilme. As exoproteínas constituem uma importante classe de moléculas que participam em diversos processos fisiológicos, tais como, sinalização celular, patogénese e remodelação da matriz. As células em biofilme são caracterizadas por padrões de expressão génica diferentes dos seus homólogos em células planctónicas. A comparação dos exoproteomas de biofilmes de *L. monocytogenes* e de células planctónicas permitiu identificar proteínas com maior evidência no estado de biofilme.

Assim, a construção de mutantes com deleções nos genes que codificam para essas proteínas auxilia a compreensão da importância das mesmas na formação dos biofilmes.

### **1.8.1 Proteína de ligação à parede celular (gene *lmo2504*)**

Lourenço *et al.* (2013) construíram um mutante com deleção no gene *lmo2504* que codifica para uma proteína de ligação à parede celular. Este tipo de proteínas podem estar envolvidas em várias funções incluindo o crescimento celular, a espessura da parede, a maturação do peptidoglicano, a própria divisão celular, a formação de flagelos e a formação de biofilmes. Os resultados obtidos por Lourenço *et al.* (2013) confirmaram o envolvimento desta proteína na formação de biofilme da estirpe 3119, uma vez que, foi observada menor capacidade de formação de biofilme no mutante, em comparação com a estirpe selvagem.

Sabe-se que as células na forma de biofilme são mais resistentes aos biocidas do que as células planctónicas, pelo que, conhecer os efeitos, na formação de biofilmes, decorrentes da deleção de genes específicos, pode contribuir para o desenvolvimento de novos biocidas que tenham como alvo as proteínas codificadas por esses genes. Desta forma, poderia ser contornada a problemática da resistência dos biofilmes que podem actuar como focos de contaminações microbianas persistentes, levando à contaminação dos alimentos, colocando em risco a saúde do consumidor.

### **1.8.2 Penicillin Binding Protein (gene *Imo1438*)**

O gene *Imo1438* codifica uma proteína denominada PBP3 (*Penicillin Binding Protein 3*). As PBP's são um grupo de enzimas responsáveis pelas etapas finais da síntese do peptidoglicano do exoesqueleto. Estas proteínas são também alvos moleculares para os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Fedarovich *et al.*, 2012). As PBP's podem ser divididas em duas categorias: de elevada massa molecular e de baixa massa molecular. Ambas são responsáveis pela polimerização do peptidoglicano e pela sua inserção na parede celular pré-existente. A PBP3 pertence à classe B, ou seja, o domínio N-terminal desempenha um papel importante na morfogénese da célula através da interacção com outras proteínas envolvidas no ciclo celular. Possui 721 aminoácidos, desempenhando um papel fundamental na divisão celular (Guinane *et al.*, 2006; Sauvage *et al.*, 2007).

Balska *et al.* (2012) demonstraram no seu estudo que uma sobre expressão do gene *Imo1438* é acompanhada por uma pequena subida da expressão de PBP4 (uma endopeptidase que quebra as pontes cruzadas entre dois filamentos polissacáridos (Sauvage *et al.*, 2007), resultando no retardamento do crescimento, encurtamento das células na fase estacionária e algumas mudanças na susceptibilidade de *L. monocytogenes* aos  $\beta$ -lactâmicos.

### **1.9 Objectivos do presente trabalho**

No presente trabalho, pretendeu-se construir um mutante da estirpe boa produtora de biofilme de *L. monocytogenes* CBISA 3119, por deleção do gene *Imo1438*. Este gene codifica uma proteína denominada PBP3. Pretendeu-se avaliar a sua capacidade de formação de biofilme em comparação com a estirpe selvagem (CBISA 3119).

Pretendeu-se igualmente, avaliar o efeito de deleção de genes específicos, na capacidade de formação de biofilme em *Listeria monocytogenes*. Para tal, foram utilizados quatro mutantes de deleção da estirpe EGDe nos genes que codificam para o sistema Tat ( $\Delta tatAC$ ), um regulador transcripcional ( $\Delta Imo0364$ ) e em genes que codificam para constituintes flagelares ( $\DeltafliF$  e  $\DeltafliI$ ). Pretendeu-se comparar a capacidade de formação de biofilme das estirpes em meio pobre e rico em nutrientes (MWB e TSB respectivamente) e a duas temperaturas distintas: 25 e 37 °C.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Estirpes utilizadas

A estirpe de *Listeria monocytogenes*, CBISA 3119 (serovar 1/2b), isolada a partir de queijo de leite de ovelha, foi selecionada para a construção do mutante  $\Delta lmo1438$  (Leite *et al.*, 2006). Estirpes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  transportando o plasmídeo pAUL-A foram também utilizadas para a construção do mutante.

Para a avaliação da capacidade de formação de biofilme, foi também usada a estirpe EGDe e respectivos mutantes, como é possível observar no **quadro 1**.

Quadro 1 - Estirpes utilizadas no presente trabalho

Estirpes Utilizadas	Características
CBISA 3119	Estirpe selvagem
EGDe (CBISA 3992)	Estirpe selvagem
CBISA 4224	EGDe $\Delta fliF$
CBISA 4225	EGDe $\Delta fliI$
CBISA 4241	EGDe $\Delta tatAC$
CBISA 4296	EGDe $\Delta lmo0364$
<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ (CBISA 4287)	Hospedeiro de clonagem
<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ (pAUL-A) (CBISA 4374)	Transporta o vector de clonagem

\* CBISA – Coleção de Bactérias do Instituto Superior de Agronomia

### 2.2 Condições de crescimento

As estirpes de *E. coli* foram inoculadas em meio LB ou em placas LA e incubadas a 37 °C. Quando requerido, foi adicionada eritromicina numa concentração de 250  $\mu$ g/ml. *L. monocytogenes* foram inoculadas em BHI ou TSB ou em placas de BHIA ou TSA e incubadas a 37 °C, 30 °C ou 42 °C com agitação, de acordo com os objectivos. Quando requerido, foi adicionada eritromicina numa concentração de 5  $\mu$ g/ml.

Para avaliação da capacidade de formação de biofilme foram também utilizadas as temperaturas de 25 °C e 37 °C, com 24 ou 48 horas de incubação, em meio TSB e MWB.

### 2.3. Meios de cultura

#### 2.3.1 Meios líquidos

##### TSB

Dissolver 30 g de meio TSB (*Tryptone Soya Broth*) desidratado (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) e 6 g de extrato de levedura (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) em 1 litro de água destilada. Autoclavar durante 20 minutos a 121 °C.

### **BHI**

Dissolver 37 g de meio BHI (*Brain Heart Infusion*) desidratado (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) em 1 litro de água destilada. Autoclavar durante 20 minutos a 121 °C.

### **BHI suplementado com 0,5 M de sacarose**

Dissolver 37 g de meio BHI desidratado (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) e 171,12 g de sacarose em 1 litro de água destilada. Autoclavar durante 20 minutos a 121 °C.

### **LB**

Dissolver 10 g de Triptona (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) em 1 litro de água destilada. Adicionar 5 g de extracto de levedura (Biokar Diagnostics, Beauvais, France). Juntar 10 g de Cloreto de Sódio (NaCl) (Merck, Darmstadt, Germany). Autoclavar durante 20 minutos a 121 °C.

### **MWB** (Meio *Weishimer* modificado)

O meio MWB é constituído por 9 soluções que no final são adicionadas por uma ordem específica, como é possível verificar no **Quadro 3**. Assim, é necessário preparar:

#### **Solução A (10x)**

Adicionar 154,8 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  e 32,8 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 500 ml de água destilada aquecida. Autoclavar durante 20 minutos a 121 °C e guardar à temperatura ambiente.

#### **Solução B (100x)**

Adicionar 20,45 g de  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 500 ml de água destilada aquecida. Autoclavar durante 20 minutos a 121 °C e guardar à temperatura ambiente.

#### **Glucose 200 g/l (20x)**

Adicionar 50 g de glucose (anidra) a 250 ml de água destilada. Esterilizar por filtração e guardar a temperatura de refrigeração.

#### **Solução de aminoácidos 10 g/l (100x)**

Adicionar 0,5 g de cada um dos aminoácidos L-Leucina, L-Isoleucina, L-Arginina, L-Metionina e L-Valina a 50 ml de água destilada. Aquecer ligeiramente até dissolver. Deixar arrefecer e esterilizar por filtração. Guardar à temperatura de refrigeração.

#### **Cisteína 5 g/l + Glutamina 30 g/l (50x)**

Adicionar 0,5 g de L-Cisteína e 3 g de L-Glutamina a 100 ml de água destilada. Esterilizar por filtração e armazenar a -20 °C em alíquotas de 10 ml

#### Citrato férrico (100x)

Adicionar 0,439 g de citrato férrico a 100 ml de água destilada. Esterilizar por autoclavagem (20 minutos a 121 °C) e guardar à temperatura ambiente ao abrigo da luz.

#### Riboflavina 50 mg/l (100x)

Adicionar 0,0025 g de riboflavina a 50 ml de ácido fórmico 1 N. Esterilizar por filtração e armazenar à temperatura de refrigeração, ao abrigo da luz.

#### Biotina 50 mg/l + Tiamina 100 mg/l (100x)

Adicionar 0,0025 g de biotina e 0,005 g de tiamina a 50 ml de água destilada aquecida. Esterilizar por filtração e armazenar a temperatura de refrigeração, ao abrigo da luz.

#### Ácido Lipóico 50 mg/l (10000x)

Adicionar 0,0025 g de ácido Lipóico em 50 ml de etanol a 70%. Esterilizar por filtração e armazenar a temperatura de refrigeração.

Quadro 2- Constituição do meio MWB

<b>Solução</b>	<b>Volume do stock necessário para 250 ml de MWB</b>
Solução A	25 ml
Solução B	2,5 ml
Glucose	12,5 ml
Mistura de 5 aminoácidos	2,5 ml
Riboflavina	2,5 ml
Biotina + Tiamina	2,5 ml
Ácido Lipóico	25 µl
Água	194,98 ml
Citrato férrico	2,5 ml
Cisteína + Glutamina	5 ml

### **2.3.2 Meios Sólidos**

#### **TSA-YE**

Dissolver 30 g de meio TSB (*Tryptone Soya Broth*) desidratado em 1 litro de água destilada. Adicionar 6 g de extrato de levedura (Biokar Diagnostics, Beauvais, França). Juntar 20 g de agar (Iberagar, Portugal). Autoclavar durante 20 minutos a 121 °C. Deixar arrefecer em



banho termostatzado à temperatura de 56 °C. Distribuir em caixas de Petri e deixar solidificar em câmara de fluxo laminar.

### **BHIA**

Dissolver 37 g de meio BHI (*Brain Heart Infusion*) desidratado (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) em 1 litro de água destilada. Juntar 20 g de agar (Iberagar, Portugal) e autoclavar durante 20 minutos a uma temperatura de 121 °C. Arrefecer em banho termostatzado à temperatura de 56 °C. Distribuir em caixas de Petri e deixar solidificar em câmara de fluxo laminar.

### **LA**

Dissolver 10 g de Triptona (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) em 1 litro de água destilada. Adicionar 5 g de extracto de levedura (Biokar Diagnostics, Beauvais, France). Juntar 10 g de Cloreto de Sódio (NaCl) (Merck, Darmstadt, Germany). Adicionar 10 g de agar (Iberagar, Portugal). Autoclavar durante 20 minutos a 121 °C. Deixar arrefecer em banho termostatzado à temperatura de 56 °C. Distribuir em caixas de Petri e deixar solidificar em camara de fluxo laminar. Conservar a 4 °C até utilização

## **2.3.3 Soluções**

### **TAE 1x**

Preparar 1 litro de solução stock (TAE 50x) misturando 242 g de Tris, 57,1 ml de ácido acético glacial (96%) (Merck, Darmstadt, Germany) e 100 ml de EDTA 0,5 M (pH 8,0) em água destilada.

### **Agarose 1%**

Pesar, para um balão Erlenmeyer de 250 ml, 1 g de agarose (BioRon, Germany). Juntar 100 ml de TAE 1x e aquecer até à dissolução do agar.

### **Solução de lise**

Para um volume de 1 ml adicionar 25 µl de SDS 10% (m/v), 5 µl de NaOH 10 M e perfazer até 1 ml com água Mili-Q esterilizada.

### **Solução de Ringer**

Dissolver uma drageia de solução de Ringer (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) em 500 ml de água destilada. Autoclavar durante 20 minutos a 121°C.

### **Tampão de Transformação**

Para um volume de 1 litro, adicionar 171,12 g de sacarose, 0,2383 g de Hepes. Acertar o pH a 7. Perfazer o volume com água destilada. Esterilizar por filtração e armazenar a temperatura de refrigeração.

### **Tampão de transformação com 10% de glicerol**

Para um volume de 1 litro, adicionar 171,12 g de sacarose, 0,2383 g de Hepes e 100 ml de glicerol. Acertar o pH a 7. Perfazer o volume com água destilada. Esterilizar por filtração e armazenar a temperatura de refrigeração

## **2.3.4 Soluções de antibióticos**

### **Eritromicina**

Para um volume de 50 ml de etanol puro, adicionar 1 g de eritromicina (stock 20 mg/ml). Esterilizar por filtração e armazenar a -20 °C.

### **Penicilina G**

Para um volume de 20 ml de etanol puro, adicionar 0,2 g de penicilina G (stock 10 µg/ml). Esterilizar por filtração e armazenar a -20 °C.

## **2.4 Procedimento com vista à construção de um mutante de *Listeria monocytogenes* por recombinação homóloga**

### **2.4.1 Obtenção de lisado de *Listeria monocytogenes***

Ressuspenderam-se 3 a 5 colónias isoladas em 50 µl de tampão de lise (SDS 0,25% (m/v) e NaOH 0,05 M). As suspensões celulares obtidas foram fervidas durante cerca de 10 minutos e, posteriormente, arrefecidas em gelo.

### **2.4.2 PCR**

#### **• Primers utilizados**

O gene *lmo1438* possui 2136 pares de bases. A partir do DNA genómico de *L. monocytogenes* FSL J1-175 (serovar 4b) foram desenhados primers para amplificar uma região a montante do gene (fragmento A) com 722 pares de base e uma região a jusante do gene (fragmento B) com 664 pares de base. Os produtos resultantes foram posteriormente utilizados para produzir um fragmento de aproximadamente 1400 pares de base (fragmento AB).

A **figura 4** representa a posição dos *primers* utilizados relativamente ao gene *lmo1438*.

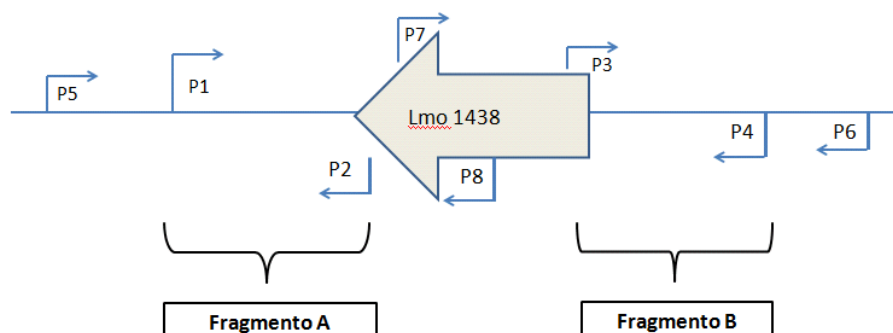


Figura 4 - Localização dos primers utilizados em relação ao gene *lmo1438*

Para a construção do mutante de *L. monocytogenes* foram usados os primers de forma a amplificar os fragmentos de DNA requeridos. No **quadro 3** são apresentados os primers utilizados e respectiva sequência.

Quadro 3 - *Primers* utilizados e respectivas sequências

Primers	Sequência (5' – 3')
P1	CGGGATCCACCACAATACTTATG a)
P2	TTCAGAGCGTTCTTTATTTAAACGTAGTGG
P3	CCACTACGTTTAAATAAAGAACGCTCTGAA
P4	GCTCTAGAGCTGTGAGAAAAAGTGCT b)
P5	AACAATACAAGGAGG
P6	AGGCTATAAACACACAGA
P7	TCATTCCACTACGTTTAAAT
P8	TTCAGAGCGTTCTTT

a) o local de corte da enzima de restrição BamH I está assinalado a negrito

b) o local de corte da enzima de restrição Xba I está assinalado a negrito

No **quadro 4** são apresentados os conjuntos de primers utilizados bem como, o número de pares de base do fragmento a amplificar, tanto para a estirpe selvagem como para os recombinantes.

Quadro 4 - Conjunto de primers utilizados e respectivo número de pares de bases do fragmento a amplificar

Fragmentos amplificados (pb)		
Conjunto de primers	Estirpe selvagem	1º Recombinante
P5 e P4	3489	1353
P1 e P6	3540	1404
Conjunto de primers	Estirpe selvagem	2º Recombinante
P5 e P6	3654	1518
P7 e P8	2019	0

No **quadro 5** é possível observar os conjuntos de primers utilizados para obtenção do fragmento A, fragmento B e fragmento AB e respectiva dimensão.

Quadro 5 - Conjunto de primers utilizados para amplificar respectivamente o fragmento A, B e AB e respectivo número de pares de base do fragmento a amplificar

	Conjunto de <i>primers</i>	Dimensão (pb)
Fragmento A	P1 e P2	722
Fragmento B	P3 e P4	664
Fragmento AB	P1 e P4	1386

- **Mistura de amplificação**

Inicialmente foi necessário amplificar os fragmentos A e B. Após confirmação e purificação dos fragmentos, estes foram utilizados como molde para amplificação do fragmento AB por PCR com os primers P1 e P4.

De forma a verificar a ausência de contaminações, em todas as reacções foi efectuado um controlo, em que a amostra foi substituída por água Mili-Q esterilizada.

A composição da mistura utilizada na reacção de amplificação dos fragmentos A, B e AB encontra-se descrita nos **quadros 6 e 7**.

Para confirmação dos transformantes de *E.coli* e *L. monocytogenes* utilizou-se a mistura de amplificação descrita no **quadro 8**.

Quadro 6 - Composição da mistura de amplificação para o fragmento A e B

Fragmento A		Fragmento B	
Componentes	Concentração Final/Volume (µl)	Componentes	Concentração Final/Volume (µl)
Água Mili-Q	- / 16,1 µl	Água Mili-Q	- / 14 µl
Tampão10x (Invitrogen)	1 x / 2,5 µl	Tampão10x (Invitrogen)	1 x / 2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (Invitrogen) 50 mM	2 mM / 1 µl	MgCl <sub>2</sub> (Invitrogen) 50 mM	2 mM / 1 µl
dATP (Invitrogen) 10mM	0,2 mM / 0,5 µl	dNTP mix (Invitrogen) 10 mM	0,8 mM / 2 µl
dCTP (Invitrogen)	0,2 mM / 0,5 µl		
dGTP (Invitrogen)	0,2 mM / 0,5 µl		
dTTP (Invitrogen)	0,2 mM / 0,5 µl		
Primer 1 10 mM	0,4 mM / 1 µl	Primer 3 10 mM	0,4 mM / 2 µl
Primer 2 10mM	0,4 mM / 1 µl	Primer 4 10mM	0,4 mM / 2 µl
Amostra	- / 1 µl	Amostra	- / 1 µl
Taq DNA polimerase (Invitrogen) 5 U/µl	1,5 U / 0,3 µl	Taq DNA polimerase (Invitrogen) 5 U/µl	2,5 U / 0,5 µl
<b>Total</b>	<b>25 µl</b>	<b>Total</b>	<b>25 µl</b>

Para a reacção de amplificação do fragmento AB, foi necessário quantificar o DNA, no que diz respeito aos fragmentos A e B. Utilizou-se o equipamento NanoDrop, USA para a quantificação, sendo necessário 2 µl de cada amostra para a leitura.

Quadro 7 - Composição da mistura de amplificação para o fragmento AB

Fragmento AB	
Componentes	Concentração Final/Volume (µl)
H <sub>2</sub> O	Perfazer até 25 µl
Tampão 10x (Nzy Tech)	1 x / 2,5 µl
dNTPmix 10mM	0,2 mM / 0,5 µl
Primer 1 10 mM	0,4 mM / 1 µl
Primer 4 10mM	0,4 mM / 1 µl
Fragmento A	200 ng
Fragmento B	200 ng
Taq DNA Polimerase 500 U /µl	250 U / 0,5 µl
<b>Total</b>	<b>25 µl</b>

Quadro 8 - Mistura de amplificação para confirmação dos transformantes

Componentes da mistura de reacção	Concentração Final / Volume (µl)
Água Mili-Q	- / 19,75 µl
Tampão 10 x (Nzy TECH)	1 x / 2,5 µl
dNTP mix 10 mM (Invitrogen)	0,2 mM / 0,5 µl
Primer directo para <i>lmo1438</i> 10 mM	0,4 mM / 1 µl
Primer reverso para <i>lmo1438</i> 10 mM	0,4 mM / 1 µl
Primer directo para ORF 2819 10 mM	0,4 mM / 1 µl
Primer reverso para ORF 2819 10 mM	0,4 mM / 1 µl
Amostra	- *
Taq DNA polimerase (NzyTech) / 500 U/µl	125 U / 0,25 µl
<b>Total</b>	<b>25 µl</b>

\*Biomassa de uma colónia

- **Condições de amplificação para os fragmentos A, B e AB e confirmação dos recombinantes**

Os microtubos PCR, com o volume e a composição referidos no ponto acima, foram colocados no termociclador (Eppendorf MasterCycler personal, Hamburgo, Alemanha) cuja tampa se encontrava aquecida a 105 °C de modo a prevenir a ocorrência de evaporações durante os ciclos térmicos. O programa utilizado no termociclador encontra-se descrito no **Quadro 9**.

Quadro 9 - Condições de PCR

Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Etapa
1	95	5	Desnaturação Inicial
	95	0,5	Desnaturação
35	40 – 50	1	Emparelhamento
	72	2	Extensão
1	72	10	Extensão complementar

#### 2.4.3 Electroforese

Terminada a reacção de amplificação, a 5 µl de amostra juntou-se 2 µl de tampão de amostra (Bioron, Germany). As amostras assim preparadas foram carregadas no gel de agarose (1% m/v) em tampão TAE 1x e submetidas a electroforese durante 60 minutos a 70 V. Como marcador molecular foi utilizado o 10 000bp + 1kb DNA ladder (Bioron, Germany).

#### 2.4.4 Análise do gel e purificação das amostras

Terminada a corrida electroforética, os géis foram colocados numa tina contendo uma solução de brometo de etídio durante aproximadamente 10 minutos. Após este período os géis foram visualizados no analisador de imagens Bio-Rad Gel Doc 2000™ (Bio-Rad Laboratories, Segrate, Milão, Itália).

A purificação do DNA dos fragmentos analisados, a partir do gel de agarose do produto PCR, foi efectuada de acordo com as instruções do kit de purificação de DNA (Vivantis, USA)

#### 2.4.5 Extracção e purificação do plasmídeo pAUL-A

Para a construção do mutante foi necessário um vector suicida (plasmídeo pAUL-a). Este plasmídeo com cerca de 9200 pb tem uma marca de resistência à eritromicina (Chakraborty *et al.*, 1992).

Para a extração e purificação do plasmídeo pAUL-a ressuspenderam-se 1 a 2 colónias da estirpe de *E.coli* com o plasmídeo em LB com uma concentração de eritromicina de 250

µg/ml. Após a incubação da cultura, procedeu-se à extracção do plasmídeo de acordo com as instruções do kit de extracção de plasmídeos (Vivantis,USA).

#### 2.4.6 Obtenção do plasmídeo recombinante

O plasmídeo pAUL-a foi linearizado com as enzimas de restrição Xba I e BamH I. O fragmento AB foi digerido com as mesmas enzimas para que posteriormente pudesse ocorrer a ligação entre o plasmídeo e fragmento AB. Nos **quadros 10 e 11** são apresentadas os componentes e respectivos volumes necessários para digestão.

Foi necessário efectuar uma precipitação do DNA entre cada digestão. A precipitação foi realizada com a adição de 0,25 volumes de acetato de amónio 10 M e 2,5 volumes de etanol absoluto frio. A mistura repousou 30 minutos a -70 °C ou durante a noite a -20 °C. Posteriormente, recolheu-se o DNA por centrifugação (12000 g, 15 minutos, 4 °C). Foram efectuadas duas lavagens com etanol a 70% (v/v) (500 µl) com as condições de centrifugação acima referidas. Por fim deixou-se secar ao ar e dissolveu-se o sedimento em água Mili-Q.

Tanto o plasmídeo, como o fragmento, foram incubados a 37 °C durante a noite para a digestão com a enzima Xba I e uma hora à mesma temperatura para a enzima de restrição BamH I. Quando necessário quantificar o DNA, utilizou-se o equipamento NanoDrop, USA.

Quadro 10 - Componentes e respectivos volumes utilizados para a digestão com a enzima de restrição Xba I

<b>Digestão com enzima de restrição Xba I</b>	
Componentes	Concentração Final/Volume (µl)
H <sub>2</sub> O	- / 8,16 µl
Tampão 10x (Invitrogen)	1 x / 2 µl
BSA 0,1% (Invitrogen)	2 µl
DNA	6,84 µl (máximo de 100 ng/µl)
Xba I / 100 U/µl (Invitrogen)	100 U / 1 µl
<b>Total</b>	<b>20 µl</b>

Quadro 11 - Componentes e respectivos volumes utilizados para a digestão com a enzima de restrição BamH I

<b>Digestão com enzima de restrição BamH I</b>	
Componentes	Concentração Final/Volume (µl)
H <sub>2</sub> O	- / 7,8 µl
Tampão 10x (Sigma-Aldrich)	1 x / 2 µl
DNA	10 µl (máximo de 100 ng/µl)
BamH I 1000 U / µl (Sigma-Aldrich)	200 U / 0,2 µl
	<b>20 µl</b>

De forma a obter o plasmídeo recombinante foi necessário efectuar a ligação do vector (plasmídeo pAUL-a) com ao inserto (fragmento AB). O **quadro 12** indica os componentes necessários bem como os volumes requeridos para efectuar a ligação. A mistura foi incubada a 13 °C durante 24 horas.

Quadro 12 - Componentes e respectivos volumes utilizados para a recção de ligação

Componentes	Concentração Final/Volume (µl)
H <sub>2</sub> O	- / 7 µl
Tampão 10x (Bioline)	1 x / 2 µl
ATP 10 mM	1 mM / 2 µl
Inserto	6 µl (cerca de 90 ng/µl)
Vector	1,5 µl (cerca de 45 ng/µl)
Enzima ligase 5 U/µL (Bioline)	7,5 U / 1,5 µl
<b>Total</b>	<b>20 µl</b>

#### 2.4.7 Preparação de células competentes de *E.coli*

A partir de uma placa de LA foi retirada uma colónia para 10 ml de LB e incubou-se a 37 °C com agitação (250 rpm) durante a noite. Desta cultura retirou-se 1 ml para 100 ml de LB e incubou-se novamente nas mesmas condições até um crescimento com absorvância =0,3. Assim que atingiu este crescimento, colocou-se o frasco no frio durante 10 minutos. A suspensão foi centrifugada a 3,000 rpm durante 15 minutos e ressuspendeu-se o sedimento em 40 ml de CaCl<sub>2</sub>. Foi efectuada nova centrifugação e ressuspendeu-se gentilmente o sedimento em 3 ml de CaCl<sub>2</sub> frio. O frasco foi colocado em gelo durante pelo menos três horas. Por fim adicionou-se 1 ml de glicerol e distribuíram-se alíquotas de 200 µl em microtubos de 1,5 ml refrigerados. As alíquotas foram imediatamente congeladas a -80 °C. Para transformar *E.coli* juntou-se 10 µl de solução de DNA de plasmídeo recombinante, obtido como descrito no ponto 2.4.6, com 75 µl de células competentes. A mistura foi colocada durante 30 minutos no gelo. De seguida, procedeu-se a um choque térmico durante 2 minutos a 42 °C, sendo a mistura colocada novamente no gelo durante mais 5 minutos. Adicionou-se 1 ml de LB e incubou-se uma hora a 37 °C. Foram inoculados 200 µl de suspensão por placa de LA com eritromicina (250 µg/ml). Os transformantes de *E.coli* foram sujeitos a confirmação por PCR com os *primers* P1 e P4, como descrito no ponto 2.4.2 (**quadro 8**).

#### 2.4.8 Preparação de células de *Listeria monocytogenes* para electroporação

Utilizou-se uma adaptação do método descrito por Park et al. (1990). Foi transferida uma colónia de *L. monocytogenes* CBISA 3119 para 15 ml de BHI suplementado com 0,5 M de



sacarose e incubou-se a 37 °C durante a noite. Desta suspensão foi retirado 1 ml para 200 ml de BHI suplementado com 0,5 M de sacarose e incubou-se a 37 °C com agitação (200 rpm) até um crescimento de  $A_{600\text{ nm}}=0,2$ . Adicionou-se 10 µg/ml de penicilina G e incubou-se novamente nas mesmas condições do passo anterior, durante duas horas. Após este período, as células foram transferidas assepticamente para um frasco *Shott* gelado e centrifugou-se a 3000 rpm durante 10 minutos. As células foram lavadas três vezes com 100 ml de tampão de transformação gelado. Após as lavagens as células foram ressuspensas em 500 µl de tampão de transformação suplementado com 10% (v/v) de glicerol refrigerado e foram distribuídos em alíquotas de 50 µl em microtubos igualmente refrigerados. As células que não foram utilizadas foram armazenadas a -80 °C.

A uma das alíquotas adicionou-se 1,5 µl de plasmídeo recombinante e colocou-se em gelo durante 15 minutos. A mistura foi transferida para uma cuvete (0,2 ml) refrigerada e manteve-se durante 5 minutos no gelo. As bactérias foram posteriormente electroporadas nas seguintes condições: 400 Ω; 10 KV/cm. A cuvete foi removida do electroporador e adicionou-se imediatamente 500 µl de BHI suplementado com 0,5 M sacarose. A solução foi transferida para um microtubo e incubou-se durante 1h30 minutos a 37 °C. Após a incubação a solução foi inoculada em placas de BHI contendo eritromicina (5 µg/ml). As colónias de *Listeria* transformadas surgiram ao fim de 24-48 horas. Os transformantes de *L. monocytogenes* foram sujeitos a confirmação através de PCR, de forma semelhante ao procedimento descrito em 2.4.2, (quadro 9).

## **2.5 Avaliação da capacidade de formação de biofilme: estirpe selvagem versus respectivo mutante**

### **2.5.1 Construção de uma recta de calibração**

A estirpe de *L. monocytogenes* EGDe e quatro dos seus mutantes foram seleccionados para se proceder a uma avaliação da sua capacidade de formação de biofilme, tendo-se utilizado três métodos distintos. Estes ensaios necessitam da preparação de inóculos de concentração conhecida, pelo que, é necessário proceder-se á construção de uma recta de calibração, fazendo corresponder os valores de absorvância a 600 nm às respectivas concentrações celulares, expressas em UFC/ml.

Para a construção da recta de calibração, as leituras da absorvância foram realizadas em espectrofotómetro (Boeco, Germany) e utilizada a estirpe 3119 de *L. monocytogenes*.

A estirpe foi incubada em meio TSA a 37 °C durante a noite, e recolhida biomassa com o auxílio de uma ansa para ressuspensão em solução de Ringer em tubos Falcon, de modo a se obter uma absorvância máxima de 0,5. A partir desta suspensão foram efectuadas as diluições adequadas e os seus respectivos valores de absorvância foram registados. A determinação do número de UFC foi efectuada através de espalhamento em meio TSA de

diluições decimais da suspensão previamente obtida. As diluições foram efectuadas de modo a obter placas contáveis (entre 30-300 UFC/placa).

### **2.5.2 Avaliação da capacidade de formação do biofilme pelo método do cristal violeta**

Para avaliação da capacidade de formação de biofilme foi utilizado o método de cristal violeta proposto por Christensen *et al.* (1985). Este método baseia-se na aplicação do corante de cristal violeta ao biofilme, seguido da extracção com álcool do corante ligado e da sua quantificação através da medição da absorvância da solução de álcool.

A partir de culturas conservadas a -80 °C, foram inoculadas placas de TSA a 37 °C durante a noite. As células foram ressuspensas em meio TSB ou em meio MWB de forma a obter-se um inóculo com uma concentração de  $1 \times 10^7$  UFC/ml (de acordo com a recta de calibração obtido através do procedimento descrito no ponto acima). Utilizando microplacas de 96 poços colocou-se 150 µl do inóculo em cada poço, sendo utilizadas 6 réplicas por inóculo. Outros 6 poços da microplaca foram preenchidos com meio de cultura, servindo desta forma como controlo de esterilidade do meio. Após a inoculação, a microplaca foi selada com parafilme e incubada durante 24 horas, a 25 °C ou 37 °C, com 150 rpm. Após o período de incubação, o conteúdo da microplaca foi removido e foram efectuadas três lavagens com 150 µl de água destilada esterilizada de forma a remover as células planctónicas. A microplaca foi deixada a secar durante 30 minutos em posição invertida. Após os 30 minutos que permitiram a secagem da microplaca, cada poço foi corado com 50 µl de cristal violeta 0,1% (m/v), durante 45 minutos. Depois de corados, os poços foram lavados três vezes com 150 µl de água destilada esterilizada para remoção do corante não fixado pelo biofilme. De seguida, foram colocados 200 µl de etanol 95% (v/v) de modo a solubilizar o corante fixado pelo biofilme. De cada um dos poços foram retirados 100 µl e transferidos para uma nova microplaca. De seguida foi efectuada a leitura das absorvâncias no *Microplate Reader* a 600 nm (BIORAD modeloxx, cidade, País). Foram realizados três ensaios distintos.

### **2.5.3 Avaliação da capacidade de formação do biofilme pelo método do vermelho de ruténio**

O método do vermelho de ruténio descrito por Borucki *et al.* (2003) permite avaliar a capacidade de formação do biofilme, tendo como alvo os exopolissacáridos presentes na matriz do biofilme.

A partir de culturas puras conservadas a -80 °C, foram inoculadas placas de TSA. Após o período de incubação, foi preparado um inóculo em meio TSB ou MWB e incubado durante 24 horas a 37 °C. Após a incubação, foi realizada uma diluição de 1:40 da suspensão, sendo necessário utilizar o vórtex durante 5 segundos. Foram transferidos 100 µl da suspensão

diluída para 7 poços e foram preparados também mais 7 poços em que a suspensão foi substituída por meio de cultura para garantir o controlo de esterilidade do meio. Após a inoculação, a microplaca foi selada com parafilme e incubada durante 24 horas a 25 °C ou 37 °C. Após este período, as células não aderentes foram removidas, tendo-se adicionado de seguida 150 µl de solução de vermelho de ruténio 0,1% (m/v) a cada poço, esperando-se 45 minutos à temperatura ambiente. De seguida, o líquido de cada poço foi cuidadosamente transferido para uma nova microplaca e procedeu-se à leitura das absorvâncias no *Microplate Reader* a 450 nm. Foram realizados três ensaios distintos.

#### **2.5.4 Avaliação da capacidade de formação do biofilme em aço inoxidável por enumeração das células**

A capacidade de formação do biofilme foi também avaliada em aço inoxidável por enumeração das células, como se descreve a seguir.

Preliminarmente, foi necessário proceder-se à lavagem dos cupões de aço inoxidável. Foram utilizados cupões de 1 cm X 1 cm. Estes foram submersos em ácido fosfórico e posteriormente em água destilada. De seguida, foram submersos em acetona e posteriormente em água destilada. Os cupões foram colocados dentro de tubos de ensaio e esterilizados por autoclavagem.

A partir de culturas puras conservadas a -80 °C, foram inoculadas placas de TSA nas condições já descritas anteriormente. Após este período, foi preparado um inóculo em meio TSB ou MWB. Utilizando microplacas de 24 poços colocou-se 1,5 ml de inóculo e um cupão por poço, sendo utilizadas 4 réplicas por inóculo. Outros 4 poços da microplaca foram preenchidos com meio de cultura esterilizado. As microplacas foram seladas com parafilme e incubadas a 25 °C ou 37 °C, durante 48 horas. Após o período de incubação, os cupões foram lavados com 1 ml de solução de Ringer para remover as células não aderentes. Os cupões foram posteriormente colocados numa nova microplaca com 1 ml de Solução de Ringer com cerca de 20 esferas de vidro por baixo do cupão e cerca de 30 por cima do mesmo. A microplaca foi agitada num agitador (Titertek, Pforzheim, Germany) durante 1 minuto. Foram efectuadas diluições decimais em microtubos com solução de Ringer e inoculadas em placas de TSA de forma a obter placas contáveis. Foram realizados três ensaios distintos.

#### **2.5.4.1 Optimização das condições de recuperação de biofilmes no método dos cupões de aço inoxidável**

Foram efectuados ensaios preliminares tendo em vista a selecção do tempo de sonicação necessário e suficiente para promover o desprendimento do biofilme. Os tempos de sonicação testados foram de: 30 segundos, 1 minuto, 1 minuto e 30 segundos e 2 minutos.

#### **2.6 Análise estatística dos resultados**

Os valores obtidos para as contagens das células viáveis nos biofilmes, bem como, os valores de absorvância, foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA), com recurso ao programa Statistica 8.0 (Statsoft, Tulsa, USA). Os dados foram sujeitos ao teste de Fisher LSD, teste de diferenças mínimas significativas. Nos testes estatísticos realizados, considerou-se um valor de  $p < 0,05$  como indicador de significância estatística.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Ensaios preliminares

##### 3.1.1 Recta de calibração

De forma a conseguir obter inóculos de concentração padronizada, procedeu-se à construção de uma recta de calibração para uma estirpe de *L. monocytogenes*. Na **figura 5** é apresentada a curva de calibração obtida para uma estirpe de *L. monocytogenes* (estirpe CBISA 3119) de acordo com a metodologia descrita em 2.5.1.

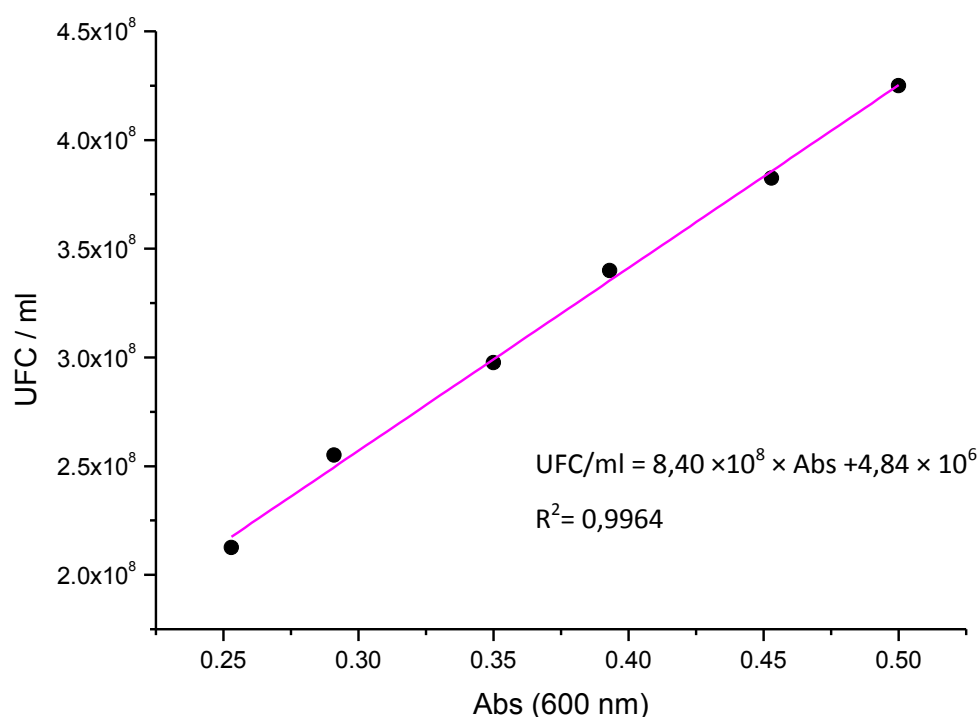


Figura 5- Recta de calibração para *L. monocytogenes* CBISA 3119 em Solução de Ringer

Através desta equação é possível determinar os estimar o número de UFC's correspondentes aos valores das absorvâncias das suspensões.

##### 3.1.2 Optimização das condições de recuperação de biofilmes a partir de cupões de aço inoxidável

De forma a identificar o tempo de sonicação necessário e suficiente para promover o desprendimento dos biofilme, foram testados diferentes tempos de sonicação: 30 segundos, 1 minuto, 1 minuto e 30 segundos e 2 minutos, tendo-se utilizado duas réplicas para cada tempo de sonicação. Para a estirpe testada (*L. monocytogenes* CBISA 3119) os valores

mais elevados de UFC/cm<sup>2</sup> foram obtidos após um minuto de sonicação (Titertek, Pforzsheim, Germany) (**quadro 13**).

Quadro 13 - Valores médios UFC/cm<sup>2</sup> obtidos para os diferentes tempos de sonicação testados

Tempos de sonicação	UFC/cm <sup>2</sup> (removidos)
30 s	1,78x10 <sup>7</sup>
1 min	2,04x10 <sup>7</sup>
1min 30 s	1,86x10 <sup>7</sup>
2 min	6,8x10 <sup>6</sup>

### 3.2 Procedimentos com vista à construção de um mutante de *Listeria monocytogenes* no gene *lmo1438*

De forma a compreender a importância da proteína codificada pelo gene *lmo1438*, uma PBP, na produção de biofilme por *L. monocytogenes*, pretendeu-se obter um mutante com deleção neste gene por recombinação homóloga, mas tal não foi possível devido a dificuldades que surgiram na transformação das bactérias.

#### 3.2.1 Amplificação dos fragmentos A e B

Foi possível obter os fragmentos A, B e AB como descrito no ponto 2.4.2. Na **figura 6** observa-se o fragmento A com cerca de 700 pb, obtido com os *primers* P1 e P2. Na **figura 7** observa-se o fragmento B, também com cerca de 700 pb, obtido com os *primers* P3 e P4. O fragmento AB com cerca de 1400 pb foi obtido a partir dos fragmentos A e B por PCR com os *primers* P1 e P4 (**figura 8**).

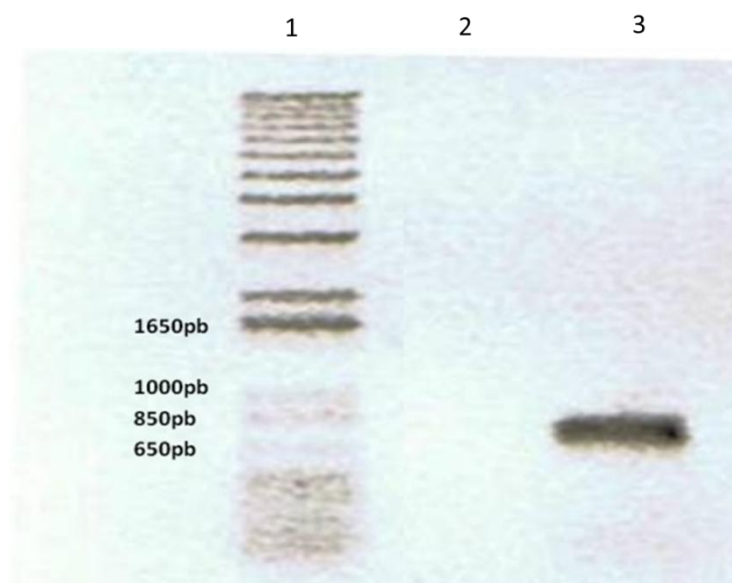


Figura 6 – Amplificação do fragmento A; 1 – Marcador molecular; 2 – Controlo negativo da reacção de PCR; 3 – Fragmento A

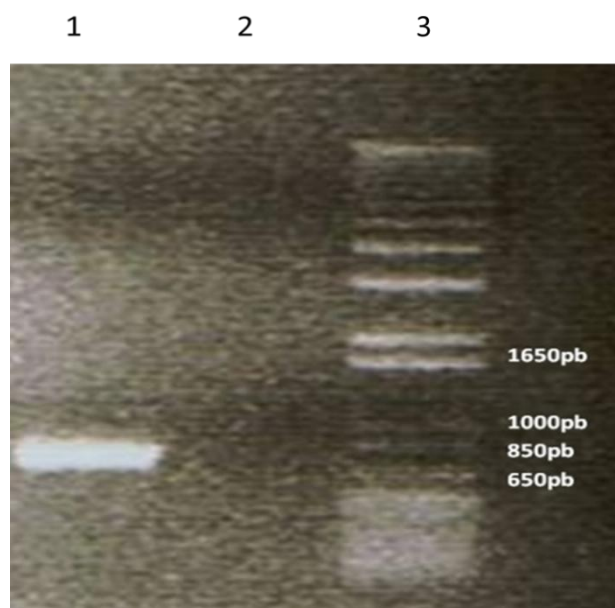


Figura 7 – Amplificação do fragmento B; 1 – Fragmento B; 2 – Controlo negativo da reacção de PCR; 3 – Marcador Molecular

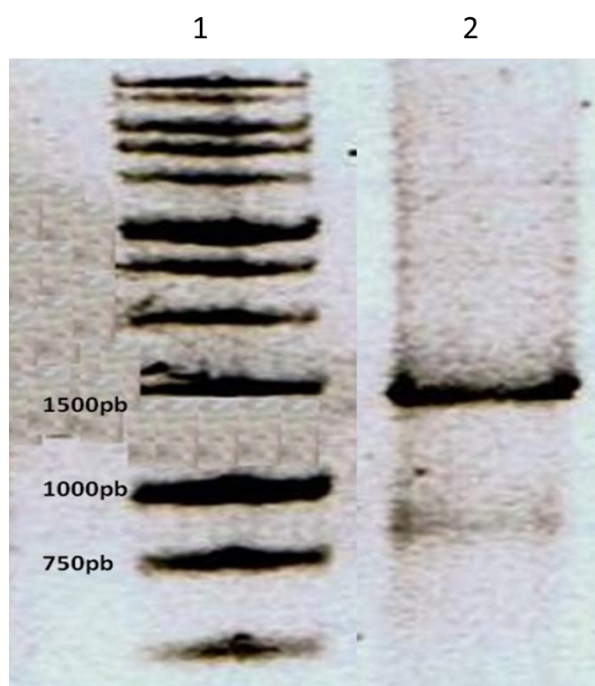


Figura 8 – Amplificação do fragmento AB; 1 – Marcador molecular; 2 – Fragmento AB

Após a transformação de *E.coli* com o plasmídeo pAUL-a ligado ao fragmento AB, as primeiras colónias surgiram ao fim de 24 h. No entanto, não foi possível obter confirmação da transformação por PCR.

### 3.2.2 Testes ao plasmídeo

De forma a verificar se o plasmídeo se encontrava ligado ao fragmento AB, procedeu-se a uma electroforese onde se comparou o plasmídeo pAUL-a intacto com o possível plasmídeo recombinante extraído de duas colónias de *E.coli* que cresceram ao fim de 24h após transformação (**figura 9**).

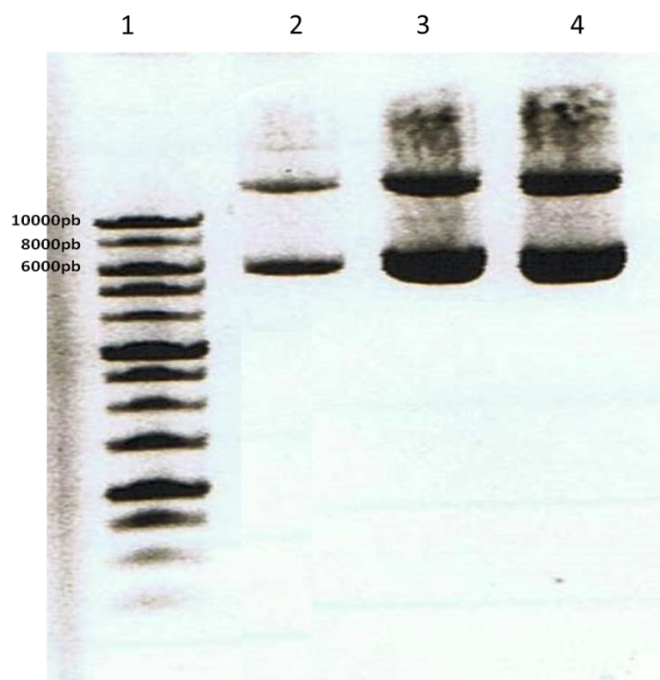


Figura 9 Electroporação em gel de agarose do plasmídeo pAUL-a e de plasmídeos extraídos de colónias de *E. coli* resistentes à eritromicina; 1 – Marcador molecular; 2 – plasmídeo pAUL-a intacto; 3 – Possível plasmídeo recombinante (colónia 1); 4 – Possível plasmídeo recombinante (colónia 2).

Devido às semelhanças entre o plasmídeo intacto e os possíveis plasmídeos recombinantes e sabendo-se que o plasmídeo pAUL-a possui cerca de 9200 pb (Chakraborty *et al.*, 1992), procedeu-se à linearização dos possíveis plasmídeos recombinantes e do plasmídeo pAUL-a com a enzima de restrição BamHI (**figura 10**).

Verificou-se que possuem o mesmo tamanho, sugerindo a perda do fragmento AB.



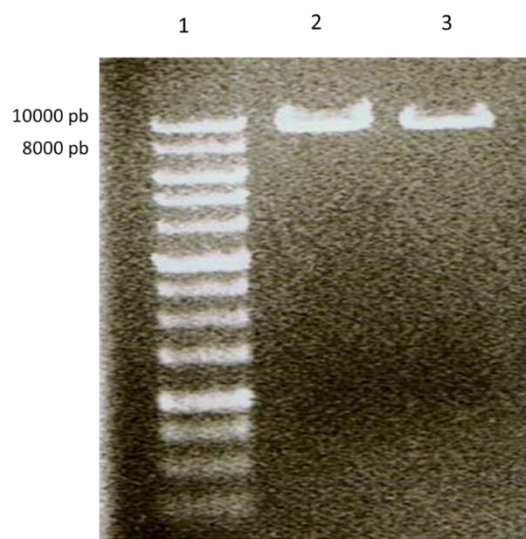


Figura 10 - Comparação do plasmídeo pAUL-a intacto e possíveis plasmídeos recombinantes digeridos pela enzima BamHI; 1 - Marcador molecular; 2 - Plasmídeo pAUL-a/BamHI; 3 - Possível plasmídeo recombinante/BamHI

### 3.2.3 Testes às enzimas de restrição e à ligase

Procedeu-se a testes às enzimas de restrição Xba I e BamHI, e à ligase, de forma a verificar a sua actvidade (**figura 11**). Foi também utilizado o plasmídeo pUC 18. Para testar a enzima Xba I utilizou-se o plasmídeo pAUL-a e foram utilizadas as condições descritas em 2.4.6. Para o teste à ligase, o plasmídeo pAUL-a foi primeiramente digerido com Xba I e procedeu-se à sua ligação nas condições já descritas em 2.4.6.

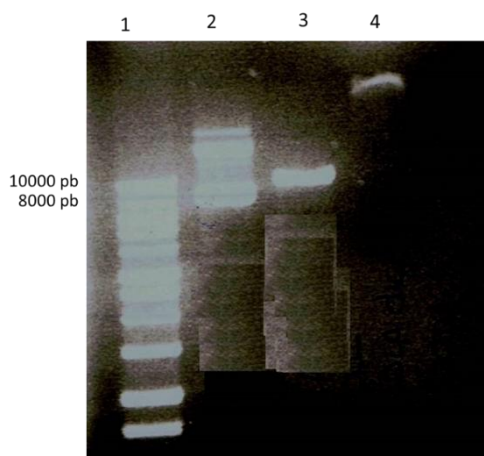


Figura 11 - Teste à enzima de restrição Xba I e à ligase com o plasmídeo pAUL-a; 1 - Marcador molecular; 2 - plasmídeo pAUL-a intacto; 3 - plasmídeo pAUL-a digerido com XbaI; 4 - plasmídeo pAUL-a digerido com Xba I e ligado

Para testar a enzima BamHI digeriu-se o plasmídeo pUC 18 (com cerca de 2700 pb), como é possível observar na **figura 12**.

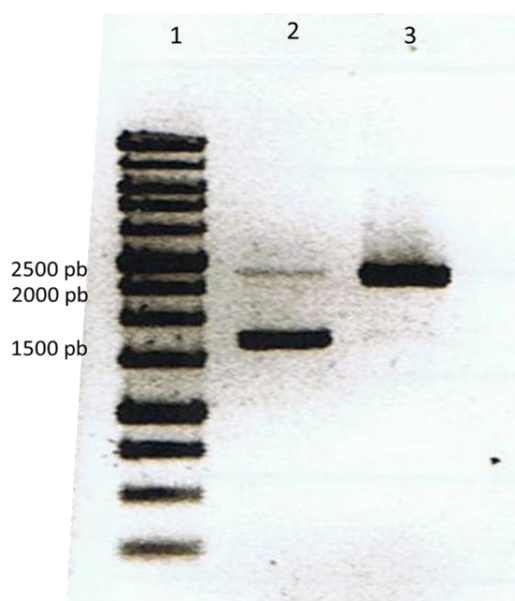


Figura 12 - Teste à enzima de restrição BamHI com o plasmídeo pUC 18; 1 - Marcador molecular; 2 - plasmídeo pUC 18 intacto; 3 - plasmídeo pUC 18 digerido com BamHI

Como é possível observar pelas figuras anteriores, ambas as enzimas de restrição e a ligase encontravam-se a funcionar correctamente, observando-se uma linearização dos plasmídeos pelas respectivas enzimas de restrição e a ligação do plasmídeo pAUL-a pela ligase.

Tendo em conta que o rendimento do fragmento AB sempre foi baixo, podem ter ocorrido perdas durante o procedimento de precipitação, levando a que o DNA utilizado para a ligação com o plasmídeo pAUL-a fosse diminuto ou inexistente.

Por outro lado, as digestões com enzimas de restrição podem não ser completas, podendo existir uma pequena fracção de plasmídeo que não é digerido. Tendo em conta que nunca foi possível confirmar a existência de AB ligado ao plasmídeo, é provável que a transformação das bactérias tenha ocorrido com plasmídeo pAUL-a intacto proveniente da possível fracção de plasmídeo não digerida.

### 3.3 Avaliação da capacidade de formação de mutantes de *L. monocytogenes*

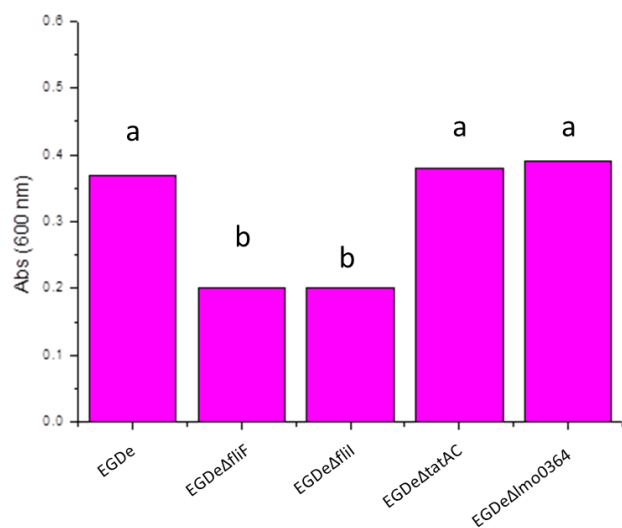
#### 3.3.1 Avaliação da capacidade de formação de biofilme em meio mínimo

##### MWB

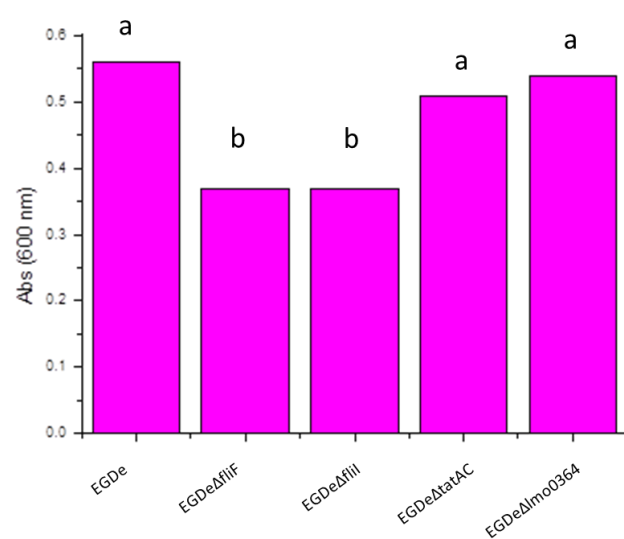
Em meio MWB, a 25 °C e a 37 °C, com o método do cristal violeta, foi possível observar que os mutantes  $\Delta fliF$  e  $\Delta fliI$  apresentavam uma capacidade de formação de biofilme estatisticamente inferior ( $p < 0,05$ ) à da estirpe selvagem (**figura 13 A e B**). À temperatura de 25 °C, com o método dos cupões de aço inoxidável, não foi possível observar nenhum mutante estatisticamente diferente da estirpe selvagem ( $p < 0,05$ ) (**figura 13 C**), no entanto a 37 °C, o mutante flagelar  $\Delta fliI$  aparenta ser uma estirpe menos produtora de biofilme em comparação com a estirpe selvagem (**figura 13 D**).

Os resultados obtidos com o método do vermelho de rutênio apresentam desvios padrões muito elevados, levando a que os resultados obtidos com este ensaio, não sejam conclusivos (**figura 13 E e F**). Tendo em conta que o método visa os exopolissacáridos do biofilme, é possível que se adapte melhor a estirpes boas produtoras de exopolissacáridos, visto que, a estirpe EGDe não é descrita como boa produtora de exopolissacáridos. Assim, pode também não ser um método adequado quando se pretende estudar mutantes.

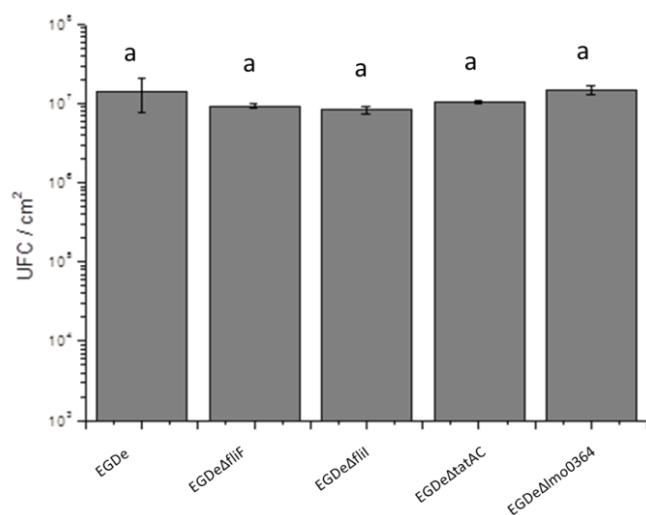
Apesar de ser uma metodologia de fácil e rápida utilização, não é comum os autores utilizarem este ensaio na avaliação da capacidade de formação de biofilme, tendo sido já descritas outras limitações, nomeadamente, a sua capacidade de ligação a outros hidratos de carbono presentes na superfície da célula, que não se encontrem relacionados com o biofilme (Borucki *et al.*, 2003).



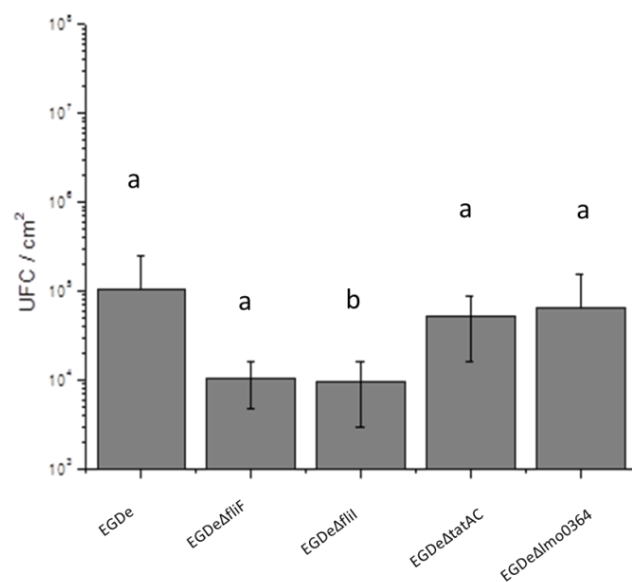
A



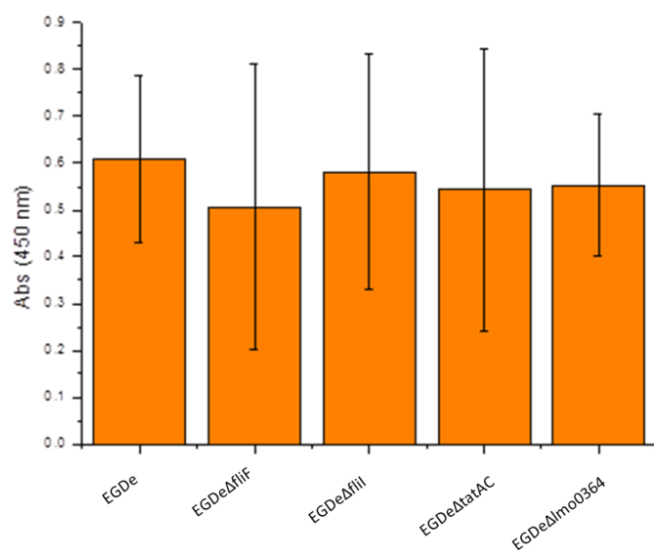
B



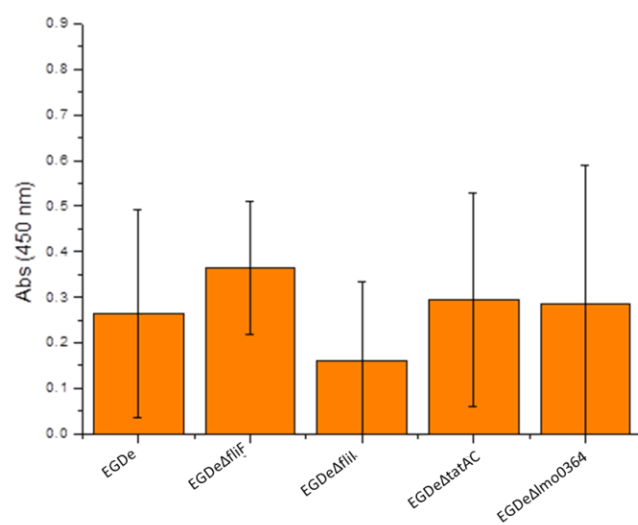
C



D



E



F

Figura 13 - Avaliação da capacidade de formação de biofilme de *L. monocytogenes* em meio MWB; A - Cristal violeta, 25 °C; B - Cristal violeta, 37 °C; C - Cupões de aço inoxidável, 25 °C; D - Cupões de aço inoxidável, 37 °C; E - Vermelho de rutênio, 25 °C; F - Vermelho de rutênio, 37 °C

Com a metodologia do cristal violeta foi possível observar que os mutantes flagelares ( $\Delta fliF$  e  $\Delta fliI$ ) parecem apresentar uma menor capacidade de formação de biofilme em relação à estirpe selvagem, assim como, o mutante flagelar  $\Delta fliI$  pela metodologia dos cupões de aço inoxidável. Estes dois genes são responsáveis pela motilidade flagelar de *L. monocytogenes*. Estes dados parecem ser concordantes com Lemon *et al.* (2007), que construíram mutantes flagelares ( $\Delta flaA$  e  $motBD23A$ ). Os autores utilizaram a metodologia do cristal violeta e verificaram uma menor capacidade de produção de biofilme dos mutantes flagelares, quando comparados com a estirpe selvagem. Apesar dos mutantes utilizados pelos autores possuírem mutações em genes diferentes dos utilizados no presente trabalho, estes resultados enfatizam a importância dos flagelos na capacidade de formação de biofilme por *L. monocytogenes*.

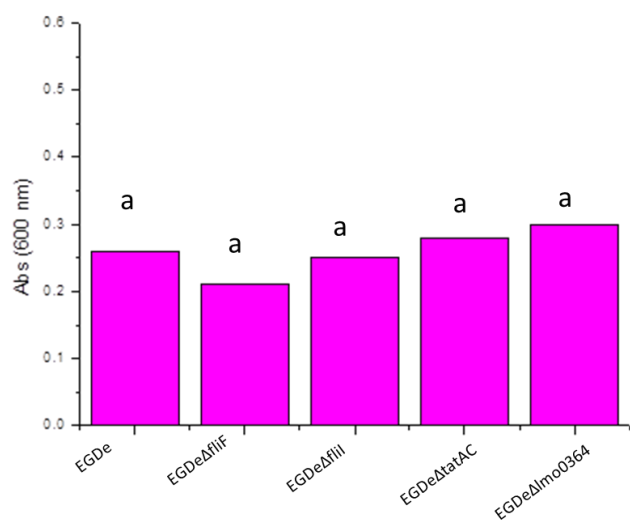
É de salientar também a importância dos flagelos em outras espécies bacterianas no que concerne à capacidade de formação de biofilme. Diversos autores constataram que mutantes flagelares possuem uma menor capacidade de formação de biofilme em espécies como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Pratt *et al.*; 1998; O'Toole *et al.*; 1998).

### **3.3.2 Avaliação da capacidade de formação de biofilme em meio complexo TSB**

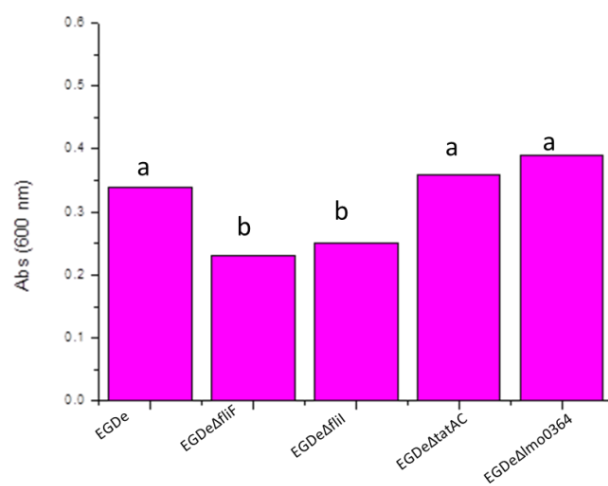
Em meio TSB, a uma temperatura de 25 °C com o método do cristal violeta, não se observaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre as estirpes mutantes e a estirpe (**figura 14 A**). Com o método dos cupões de aço inoxidável foi possível verificar que o mutante  $\Delta Imo0364$  é estatisticamente diferente da estirpe selvagem, parecendo indicar uma menor capacidade de formação de biofilme (**figura 14 C**).

A uma temperatura de 37 °C, com o método do cristal violeta, foi possível observar uma menor capacidade de formação de biofilme dos mutantes flagelares em comparação com a estirpe selvagem (**figura 14 B**) à semelhança do verificado em meio MWB, a ambas as temperaturas (**figura 13 A e B**). Com o método dos cupões de aço inoxidável não se verificaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre as estirpes mutantes e a estirpe selvagem (**figuras 14 D**).

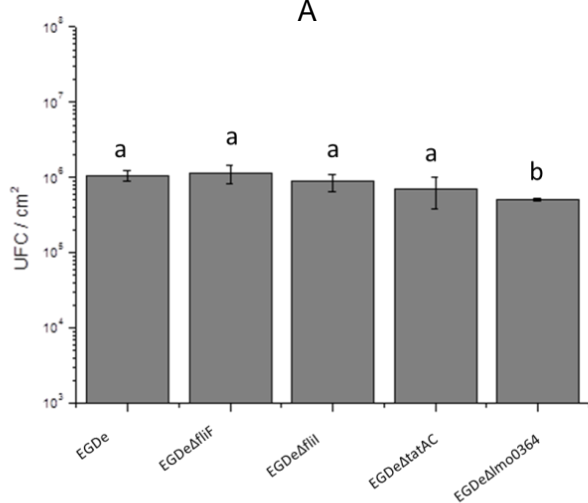
Em meio de cultura TSB, os resultados obtidos com o método do vermelho de rutênio apresentam também, desvios padrões muito elevados, levando a que os resultados obtidos com este ensaio, não tenham sido conclusivos, como já discutido acima.



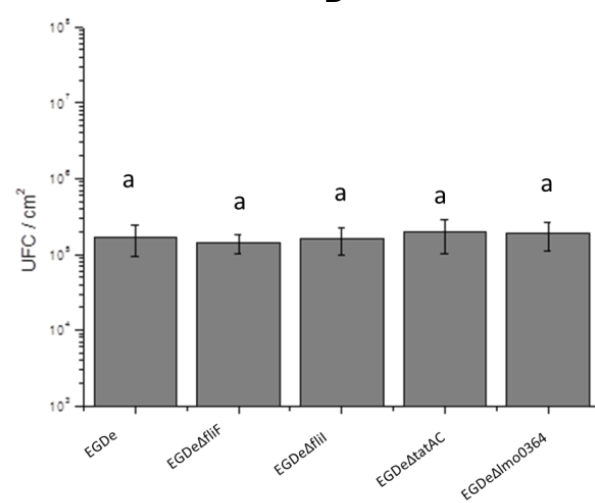
A



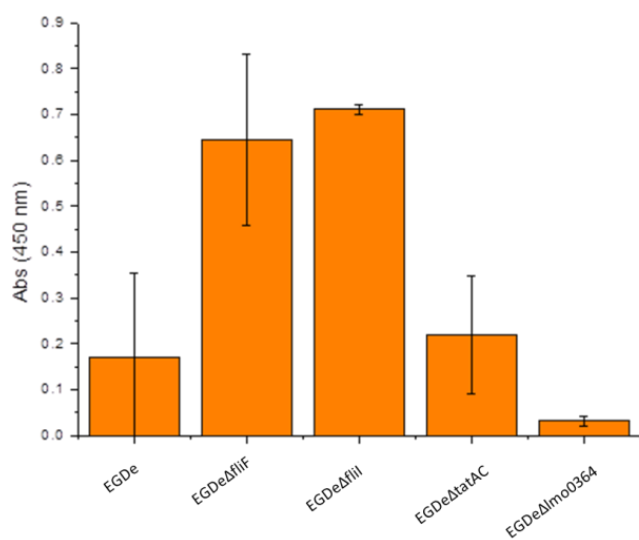
B



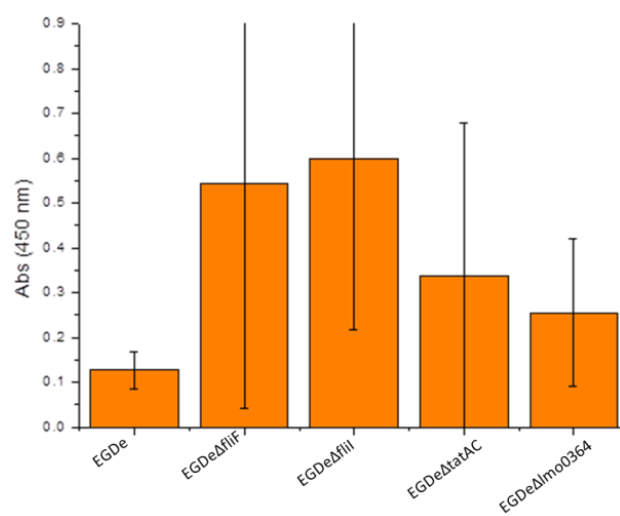
C



D



E



F

Figura 14 - Avaliação da capacidade de formação de biofilme de *L. monocytogenes* em meio TSB; A - Cristal violeta, 25 °C; B - Cristal violeta, 37 °C; C - Cupões de aço inoxidável, 25 °C; D - Cupões de aço inoxidável, 37 °C; E - Vermelho de rutênio, 25 °C; F – Vermelho de rutênio, 37 °C.

Em meio TSB a 37 °C, (**figura 14 B**) foi também possível observar diferenças significativas entre os mutantes flagelares e a estirpe selvagem, através do método do cristal violeta, à semelhança dos dados obtidos em MWB (**figura 13 A e B**). Estes dados enfatizam mais uma vez, a importância da motilidade flagelar no que concerne aos níveis de formação de biofilme.

A 25 °C em meio de cultura TSB observou-se uma menor capacidade de formação de biofilme pela estirpe mutante  $\Delta lmo0364$ , quando avaliada em cupões. o que não se verificou em mais nenhuma situação, nem com as restantes metodologias utilizadas. O gene *lmo0364* ainda se encontra pouco estudado, sabendo-se apenas que se trata de um regulador transcricional. Machado *et al.* (2013), concluíram que uma mutação neste gene não influenciava o crescimento nem a virulência, não estando possivelmente relacionado com os genes da virulência. No entanto, estes autores verificaram uma similaridade de 96% entre este regulador transcricional e o regulador DeoR proveniente de *E. coli* que, nesta bactéria, actua como repressor do metabolismo do açúcar. Apesar de não terem sido realizados estudos em biofilmes de *L. monocytogenes*, mutantes de deleção neste gene, geralmente apresentam um crescimento planctónico mais rápido, devido à não repressão do metabolismo do açúcar.

Lou *et al.* (2003) construíram um mutante de deleção no gene FruR, um repressor do metabolismo do açúcar em *Streptococcus gordonii*, verificando que esta mutação não afectava a sua capacidade de formação de biofilme.

Mais estudos com este gene são necessários de forma a clarificar o papel do gene *lmo0364* em *L. monocytogenes* e de que forma pode afectar a sua capacidade de formação biofilme.

Em ambos os meios de cultura e temperaturas testadas, não se verificaram diferenças significativas entre a estirpe selvagem e o mutante  $\Delta tatAC$ . Estes resultados são concordantes com os de Machado *et al.* (2013), que construíram um mutante de deleção neste gene, em *L. monocytogenes*, e avaliaram a sua capacidade de formação de biofilme em cupões de aço inoxidável, a 25 °C, em meio de cultura TSB. Os autores não verificaram diferenças significativas entre a estirpe mutante e a estirpe selvagem, sugerindo que o sistema Tat não apresenta um papel crítico na formação de biofilme por *L. monocytogenes*. No entanto, na maioria das espécies gram-negativas como *Legionella pneumophila*, *P. aeruginosa* e *E.coli*, este sistema foi demonstrado por diversos autores como sendo

importante na formação de biofilme (Ochsner *et al.*, 2002; De Buck *et al.*, 2005; De Buck *et al.*, 2008).

Em geral, é também possível observar uma menor produção de biofilme à temperatura de 37 °C, com a metodologia dos cupões de aço inoxidável, sendo esta redução mais acentuada em meio MWB (**figuras 13 e 14**). A esta temperatura, o biofilme é mais maduro, podendo ter ocorrido dificuldades na dispersão. A dispersão do biofilme foi realizada com o auxílio de esferas de vidro, as quais, podem não ter levado a uma eficiente remoção do biofilme do cupão de aço inoxidável. A ineficiente dispersão pode justificar os desvios padrão mais elevados à temperatura de 37 °C.

Observando apenas o comportamento da estirpe selvagem, considerando os dados obtidos com o ensaio de cristal violeta, verificam-se diferenças significativas no que concerne ao meio de cultura e à temperatura (dados não apresentados). A estirpe EGDe apresenta uma maior capacidade de formação de biofilme em meio mínimo MWB. Estes dados são concordantes com Moltz *et al.* (2005), que estudaram a capacidade de formação de biofilme de oito estirpes de *L. monocytogenes*, em diferentes condições de crescimento, utilizando a metodologia do cristal violeta. Verificaram uma maior produção de biofilme em meio de cultura MWB em comparação com meio TSB a uma temperatura de 30 °C. Também os estudos de Harvey *et al.* (2007), Zhou *et al.* (2012), Combrouse *et al.* (2013) e Kadam *et al.* (2013) demonstraram uma maior capacidade de formação de biofilme de estirpes de *L. monocytogenes* em meio mínimo, quando comparado com meio rico em nutrientes, sublinhando que as condições mínimas de nutrientes podem estimular a produção de biofilme.

No que concerne à temperatura, a estirpe EGDe, apresentou uma maior capacidade de formação de biofilme a 37 °C do que a 25 °C. Estes dados são concordantes com os de Pan *et al.* (2010) e Kadam *et al.* (2013) que verificaram um aumento significativo de formação de biofilme com o aumento da temperatura. A temperaturas superiores a 30 °C, a flagelina é reprimida na maioria das espécies de *L. monocytogenes*. No entanto, embora a mediação por flagelos tenha sido demonstrada como um meio de fixação no estágio inicial de formação de biofilme, *L. monocytogenes* pode aderir a superfícies inertes por um processo de ligação passiva independente dos flagelos (Nilsson *et al.*, 2011; Kadam *et al.*, 2013). Também Pan *et al.* (2010) demonstraram uma maior capacidade de formação de biofilme com o aumento da temperatura, sugerindo que, o aumento da hidrofobicidade das células a elevadas temperaturas, pode melhorar a aderência inicial, levando a uma densidade mais elevada do biofilme.



É também de salientar o facto de que cada metodologia é influenciada por um conjunto de factores: o material de superfície, as condições de crescimento e o método de quantificação do biofilme (Lourenço *et al.*, 2012).

O método do cristal violeta e o método do vermelho de ruténio são métodos de coloração que, apesar de possuírem diferentes alvos, foram realizados com o mesmo material de superfície (poliestireno) e com o mesmo tempo de incubação (24 h). Por outro lado, o ensaio dos cupões foi realizado em aço inoxidável e as estirpes incubadas durante 48 h.

A formação de biofilme implica diversas etapas que ocorrem ao longo do tempo, desde uma fase inicial de aderência, passando por uma fase irreversível até à maturação (Srey *et al.*, 2013). É possível que ao fim de 24 h a formação de biofilme se encontre numa fase inicial e diferente daquela em que encontra às 48 h. Assim, o comportamento das estirpes é diferente consoante a fase de formação de biofilme, o que pode explicar os diferentes resultados obtidos quando utilizada a metodologia dos cupões de aço inoxidável. Adetunji *et al.* (2008) e Bonsaglia *et al.* (2014) observaram diferenças significativas na formação de biofilme entre os períodos de 24 e 48 h e entre as 24 e as 72 h. Estes autores observaram uma formação de biofilme mais elevada após 48 h e 72 h, salientando que os tempos de incubação têm influência na produção de biofilme.

Por outro lado, também a produção de EPS é dependente da fase de formação de biofilme. Numa fase inicial de aderência, apenas uma pequena quantidade de substâncias extracelulares são produzidas, sendo esta produção mais evidente aquando do desenvolvimento da arquitectura do biofilme. Nesta fase os exopolissacáridos auxiliam no reforço da ligação entre a bactéria e o substrato e estabilizam a colónia de qualquer stresse ambiental (Srey *et al.*, 2013). Este facto pode também explicar os resultados obtidos pelo método do vermelho de ruténio, uma vez que, ao fim de 24 h, a formação de biofilme pode encontrar-se numa fase inicial de aderência, onde a produção de EPS é ainda bastante diminuta, levando a que os resultados obtidos por este método não sejam conclusivos.

Também o facto do material de superfície ser diferente pode explicar estas diferenças. Enquanto que os ensaios de coloração utilizaram polistireno como material de superfície, o ensaio dos cupões utilizou aço inoxidável. Estes materiais possuem diferentes propriedades físico-químicas, que influenciam a aderência bacteriana. O polistireno é mais hidrofóbico, com baixa energia de superfície, enquanto que, o aço inoxidável é moderadamente hidrofílico e tem uma ligeira carga negativa. *L. monocytogenes*, geralmente, inicia a formação de biofilme sobre aço inoxidável nas fendas formadas pelo polimento mecânico, enquanto que o polistireno carece desses locais de fixação (Lourenço *et al.*, 2012). Lourenço *et al.* (2012) avaliaram a capacidade de formação de biofilme de *L. monocytogenes* em superfícies de polistireno e aço inoxidável. Quando compararam os resultados,

verificaram que a capacidade de formação de biofilme parece mais afectada pelo material de superfície do que pelo fundamento dos métodos utilizados.

No presente estudo, foram apenas utilizadas cinco estirpes. Quando as estirpes se encontram sub-representadas, são menos propensas a fornecerem correlações estatisticamente diferentes no que concerne à capacidade de produção de biofilme (Lourenço *et al.*, 2012). Assim, também este facto pode ter influenciado os resultados, levando a que, as variações observadas possam, mais uma vez, não ser representativas.

#### **4. Conclusões e perspectivas futuras**

Com a realização deste trabalho foi possível verificar uma menor capacidade de formação de biofilme dos mutantes flagelares, enfatizando a importância destes genes na formação de biofilme por parte de *L. monocytogenes*. Foi também possível denotar uma menor capacidade de formação de biofilme pelo regulador transcripcional, tendo sido este resultado apenas visível com a metodologia dos cupões de aço inoxidável.

As metodologias utilizadas influenciam os resultados pela diversidade de fatores presentes. Assim, deveria procurar-se otimizar as mesmas, de modo a que os constrangimentos que pudessem suceder nos resultados não se devessem à forma como os ensaios são efetuados. Desta forma, seria também possível diminuir o desvio padrão associado. Mais estudos devem também ser desenvolvidos de modo a clarificar o papel dos diferentes genes na produção de biofilme de *L. monocytogenes*. Novos estudos semelhantes poderiam ser realizados, englobando mais estirpes de modo a haver representatividade.

## 5. Bibliografia

Adetunji, V.O.; Adegoke, G.O. – Formation of biofilme by strains of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese “wara” and its processing environmental. African Journal of Biotechnology. Vol. 7, nº16, 2008, 2893-2897p.

Almeida, G.N.; Gibbs, P.A.; Hogg, T.A.; Teixeira, T.C. – Listeriosis in Portugal: an existing but under reported infection. BMC Infectious Diseases. Vol. 6, 2006.

Balska, A.K.; Popowka, M.; Markiewicz, Z. - Re-evaluation of the significance of penicillin binding protein 3 in the susceptibility of *Listeria monocytogenes* to b-lactam antibiotics. BMC Microbiology. 2012.

Bakker, H.C.; Warchocki, S.; Wright, E.M.; Allred, A.F; Ahlstrom, C; Manuel, C.S.; Stasiewicz, M.J.; Burrell, A.; Roof, S.; Strawn, L.K.; Fortes, E; Nightingale, K.K.; Kephart, D.; Wiedmann, M. - Five new species of *Listeria* (*L. floridensis* sp. nov, *L. aquatica* sp. nov., 1 *L. cornellensis* sp. nov. *L. riparia* sp. nov., and *L. grandensis* sp. nov.) from agricultural and natural environments in the United States. IJSM Pappers in Press. 2014

Barrière, C.; Veiga-da-cunha, M.; Pons, N.; Guédon, E.; Renault, P. – Fructose utilization in *Lactococcus lactis* as a model for low GC gram-positive bacteria: its regulator, signal and DNA binding site. Journal of Bacteriology. Vol. 187, nº11, 2005, 3752-3761p.

Bassler, B.L. – Small-talk: Cell to cell communication in bacteria. Cell. Vol. 109, 2002, 421-424p.

Bertsch, D.; Rau, J.; Eugster, M.J.; Haug, M.C.; Lawson, P.A.; Lacroix, L.; Meile, L. - *Listeria fleischmannii* sp. nov. , isolated from the cheese. IJSEM Pappers in Press. 2012.

Berks, C.B; Sargent, F; Palmer, T. – The tat protein export pathway. Molecular Microbiology. Vol.35, nº2, 2000, 260-270p.

Bērziņš, A. – Epidemiologia molecular e resistência ao calor de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos. Helsínquia: Universidade de Helsínquia-Faculdade de Medicina Veterinária, 2010. 91p. Dissertação Académica

Bigot, A; Pagniez, H; Botton, E; Fréhel, C; Dubail, I; Jacquet, C; Charbit, A; Raynaud, C. – Role of FliF and FliI of *Listeria monocytogenes* in flagellar assembly and pathogenicity. Infection and Immunity, vol.73, nº9, 2005, 5530-5539p.

- Bonaventura, G.D.; Piccolomini, R.; Paludi, D.; D'orio, V.; Vergara, A.; Conter, M.; Ianieri, A. - Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 104, 2008, 1552-1562p.
- Bonsaglia, E.C.R.; Silva, N.C.C.; Fernandes Junior, A.; Tsunemi, M.H.; Rall, V.L.M. – Production of biofilme of *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control*. Vol. 35, 2014, 386-391p.
- Borucki, M.; Peppin, J.D.; White, D.; Loge, F.; Call, D.R. – Variation in biofilme formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol.69, nº12, 2003, 7336-7342p.
- Bower, C.K.; McGuire, J.; Daeschel, M.A. – The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. *Trends in Food Science and Technology*. Vol. 7, 1996, 152-157p.
- Brugère-Picoux, J. – Ovine Listeriose. *Small Ruminant Research*. Vol. 76, 2008, 12-20p.
- CARPENTIER, B.; CERF, O.; - Review – Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 145, 2011, 1-8p.
- Ceri, H.; Olson, M.E.; Stremick, C.; Read, R.R.; Morck, D.; Buret, A. – The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 37, nº7, 1999, 1771-1776p.
- Chakraborty, T., Leimeister-Wachter, M.; Domann, E.; Hartl, M.; Goebel, W.; Nichterlein, T.; Nortermans, S. – Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* required the product of the *prfA* gene. *Journal of bacteriology*. Vol. 174, nº2, 1992, 568-574p.
- Chavant, P.; Martinie, B.; Meylheuc, T.; Fontaine, M.; Hebraud, M. – *Listeria monocytogenes* LO28: Surface Physicochemical Properties and Ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 68, nº2, 2002, 728-737p.
- Chmielewski, R.A.N.; Frank, J.F. – Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. Vol. 2, 2003, 22-32p.
- Christensen, G.D.; Simpson, W.A.; Younger, J.J.; Baddour, L.M.; Barrett, F.F.; Melton, D.M.; Beachey, E.H. – Adherence of coagulase-negative *Staphylococci* to plastic tissue culture

plates: a quantitative model for the adherence of *Staphylococci* to medical devices. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 22, n°6, 1985, 996-1006p.

Combrouse, T.; Sadovskaya, I.; Faille, C.; Kol, O; Guerardel, Y.; Midelete-Bourdin, G. – Quantification of the extracellular matrix of the *Listeria monocytogenes* biofilme at different phylogenic lineages with optimization of culture conditions. Journal of Applied Microbiology. Vol.114, 2013, 1120-1131p.

Cousens, L.P.; Wing, E.J. – Innate defenses in the liver during *Listeria* infection. Immunological Reviews. Vol. 174, 2000, 150-159p.

Cruz, C.D.; Fletcher, G.C. – Assessing manufacturers recommended concentrations of commercial sanitizers on inactivation of *Listeria monocytogenes*. Food Control. Vol.26, 2012, 194-199p.

De Buck, E.; Maes, L.; Meyen, F.; Mellaert V.; Geukens, N.; Anné, J.; Lammertyn, E. – *Legionella pneumophila* Philadelphia – 1 tatB and tatC affect intracellular replication and biofilm formation. Vol. 331, 2005, 1413-1420p.

De Buck, E., Lemmertyn E.; Anné, J. – Importance of twin-arginine translocation pathway for bacterial virulence. Trends in Microbiology. Vol. 16, n°9, 2008.

De Las Heras, A.; Cain, R.J; Bielecka, M.K.; Vasquez-Boland, J.A. – Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. Current Opinion on Microbiology. Vol. 14, 2011, 118-127p.

Desvaux, M.; Hébraud, M. – The protein secretion in *Listeria*: inside out bacterial virulence. FEMS Microbial Rev. vol. 30, 2006, 774-805p.

Donlan, R.M.; Costerton, J.W. – Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. Clinical Microbiology Reviews. Vol. 15, n°2, 2002, 167-193p.

Doumith, M.; Buchrieser, C.; Glaser, F.; Jacquet, C.; Martin, P.; - Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology. Vol.42, n°8, 2004, 3819-3822p.

Eirini, C.; Belessi, A.; Antonia, S.; Gounadaki, S.; Psomas, A.; Skandamis, N. – Efficiency of different sanitation methods on *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions. International Journal of Food Microbiology. Vol. 145, 2011, 46-52p.

European Food Safety Authority. EFSA Journal 2014; 12(2):3547

Faleiro, M.L.; Andrew, P.W.; Power, D. – Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. International Journal of Food Microbiology. Vol. 84, nº2, 2003, 207-216p.

Fedarovich, A.; Nicholas, R.A.; Davies, C. – The role of the  $\beta 5$ – $\alpha 11$  Loop in the Active-Site Dynamics of Acylated Penicillin-Binding Protein A from *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Molecular Biology. Vol. 418, 2012, 316-330p.

Ferreira, C.; Pereira, A.M.; Pereira, M.C.; Simões, M.; Melo, L.F. – Biofilm control with new microparticles with immobilized biofilme. Heat Transfer Engineering. Vol. 34, 2013, 712-718p.

Gaigalat, L.; Schluter, J.P.; Hartmann, M.; Mormann, S.; Tauch, A.; Puhler, A.; Kalinowski, J. – The DeoR-type transcriptional regulator SugR acts as a repressor for genes encoding the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS) in *Corynebacterium glutamicum*. BMC Molecular Biology. Vol.8, 2007.

Gandhi, M.; Chikindas, M.L.; - *Listeria* – a foodborn pathogen that knows how to survive. International Journal of Food Microbiology. Vol.113, 2007, 1-15p.

Guinane, C.M.; Cotter, P.D.; Paul Ross, R.; Hill, C. – Contribution of Penicillin-Binding Protein Homologous to Antibiotic Resistance, Cell Morphology and Virulence of *Listeria monocytogenes* EGDe. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 50, nº8, 2006, 2824-2828p.

Graves, L.M.; Helsel, L.O.; Steigerwalt, A.G.; Morey, R.E.; Daneshvar, M.I.; Roof, S.E.; Orsi, R.H.; Fortes, E.D.; Milillo, S.R.; Bakker, H.C.; Wiedmann, M.; Swaminathan, S.; Sauders, B.D.; - *Listeria marthi* sp.nov., isolated from the natural environmental, Finger Lakes National Forest. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol.60, 2010, 1280-1288p.

Hain, T.; Steinweg, C.; Chakraborty, T. – Comparative and functional genomics of *Listeria* spp. Journal of Biotechnology. Vol.126, 2006, 37-51p.

Halter, A.L.; Neuhaus, K.; Scherer, S. – *Listeria weihenstephanensis* sp.nov.; isolated from the water plant *Lemna trisulca* of a German fresh water pond. IJSEM. Pappers in Press. 2012.

Harvey, J.; Keenan, K.P.; Gilmour, A. – Assessing biofilme formation by *Listeria monocytogens* strains. Food Microbiology. Vol. 24, 2007, 380-392p.

Hayes, P.S.; Feeley, J.C.; Graves, L.M.; Ajello, G.W.; Fleming, D.W. – Isolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 51, nº2, 1986, 438-440p.

Ibusquiza, P.S.; Herrera, J.J.R; Cabo, M.L; - Resistance to benzalkonium chloride, peracetic acid and nisin during formation of mature biofilms by *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*. Vol. 28, 2011, 418-425p.

Kadam, S.R.; Den Besten, H.M.W.; Veen, S.; Zwietering, M.H.; Moezelaar, R.; Abee, T. – Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilme formation: impact of growth condition, serotype and strain origin. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. nº165, 2013, 259-264p.

Kalmokoff, M.L; Austin, J.W.; Wan, X.D.; Sanders, G.; Banerjee, S.; Farber, J.M. – Adorption, attachment and biofilme formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. *Journal of Applied Microbiology*. Vol.91, 2001, 725-734p.

Kumar, C.G.; Anand, S.K. – Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 42, 1998, 9-27p.

Lecuit, M. – Human listeriosis and animal models. *Microbes and Infection*. Vol.9, 2007, 1216-1225p.

Ledala, N; Sengupta, M; Muthayan, A; Wilkinson, B,J; Jayaswal, R,K. – Transcriptomic response of *Listeria monocytogenes* to iron limitation and fur mutation. vol.76, nº2, 2010, 406-416p.

Leite, P.; Rodrigues, R.; Ferreira, M.;Ribeiro, G.; Jacquet, C.;Martin, P.; Brito, L. – Comparative characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from Portuguese farmhouse ewe's cheese and from humans. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 106, 2006, 111-121p.

Lemon, K,P.; Higgins, D,E.; Kolter, R. - Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilme forming. *Journal of Bacteriology*. Vol.189, nº12, 2007, 4418-4424p.

Leqlercq, A.; Clermont, D.; Bizet, C.; Grimont, P.A.D.; Fléche-Matéos, A.; Roche, S.M.; Buchrieser,C; Cadet-Daniel, V; Monnier, A.; Lecuit, M.;Allerberger, F. – *Listeria rocourtiae*, sp.nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol 60, 2010, 2210-2214p.

Liu, D.; Lawrence, M.L.; Ainsworth, A.J.; Austin, F.W. – Toward an improved laboratory definition of *Listeria monoytogens* virulence. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 118, 2007, 101-115p.



Lou, C.Y.; Mitrakul, K.; Voss, I.B.; Hughes, C.V.; Ganesshkumar, N. – Involvement of an inducible fructose phosphotransferase operon in *Streptococcus gordonii* biofilme formation. Journal of Bacteriology. Vol. 185, nº21, 2003, 6241-6254p.

Lourenço, A. – Determinação da susceptibilidade de biofilmes de *Listeria monocytogenes* a agentes sanificantes. Lisboa: Universidade Nova de Lisboa – Faculdade de Ciencias e Tecnologias, 2009. 83p. Tese de Mestrado em Tecnologia Alimentar.

Lourenço, A.; Neves, E.; Brito, L. – Susceptibility of *Listeria monocytogenes* from traditional cheese-dairies to in-use sanitizers. Food Control. Vol. 20, 2009, 585-589p.

Lourenço, A.; Rego, F.; Brito, L.; Frank, J.F. – Evaluation of methods to Acess the Biofil-Formig Ability of *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection. Vol. 75, nº8, 2012, 1411-1417p.

Lourenço, A.; Heras, A.L.; Scotti, M.; Vasquez-Boland, J.; Frank, J.F.; Brito, L. – Comparison of *Listeria monocytogenes* exoproteomes from biofilme and planktonic state: Imo2504, a protein associated with biofilms. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 79, nº19, 2013, 6075-6082p.

Luber, P.; Crerar, S.; Dufour, C.; Farber, J.; Datta, A.; Todd, E. – Controlling *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: working towards global scientific consensus and harmonization – Recommendations for improved prevention and control. Food Control. Vol. 22, 2011, 1535-1539p.

Machado, H.R. – The tat pathway in *Listeria monocytogenes*. Lisboa: Universidade de Lisboa: Faculdade de Ciencias, 2011, 54p. Tese para obtenção do grau de mestre em Microbiologia Aplicada.

Machado, H.; Lourenco, A.; Carvalho, L.; Cabanes, D; Kallipolites, B; Brito, L. – The Tat pathway is prevalente in *Listeria monocytogenes* lineage II and is not required for infection and spread in host cells. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. Vol. 23, 2013, 209-218p.

Mah, T.F.C.; O' Tool, M. A.- Mechanismos of biofilme resistance to antimicrobial agents. Trends in Microbiology. Vol. 9, nº1, 2001, 34-38p.

Matsukawa, M.; Greenberg, E.P. – Putative Exopolysaccharide Synthesis Genes Influence *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. Journal of Bacteriology. Vol. 186, nº 14, 2004, 4449-4456p.

Moltz, A.G. – Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. Journal of Food Protection. Vol. 6, 2005, 92-97p.

Motarjemi, Y.; Moy, G.; Todd, E. – Encyclopedia of Food Safety. 1<sup>st</sup> Ed. San Diogo: Academic Press, 2014. 2356p.

Nadon, C.A.; Woodward, D.L.; Young, C.; Rodgers, F.G.; Wiedman, M. – Correlations between Molecular Subtyping and Serotyping of *Listeria monocytogenes*. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 39, n<sup>o</sup>7, 2001, 2704-2707p.

Nakamura, H.; Hatanaka, M.; Ochi, K.; Nagao, M.; Ogasawara, J.; Hase, A.; Kitase, T.; Haruki, K.; Nishikawa, Y. – *Listeria monocytogenes* isolated from cold-smoked fish products in Osaka city, Japan. International Journal of Food Microbiology. Vol. 94, n<sup>o</sup>3, 2004, 323-328p.

Nilsson, R.E.; Ross, T.; Bowman, J.P. – Variability in biofilme production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. International Journal of Food Microbiology. Vol. 150. 2011, 14-24p.

Ochsner, U.A.; Snyder, A.; Vasil, A.I.; Vasil, M.L. –Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis. PNAS. Vol.99, n<sup>o</sup>2, 2002, 8312-8317p.

O'Toole, G.A.; Kolter, R. – Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilme development. Molecular Microbiology. Vol. 30, n<sup>o</sup>2, 1998, 295-304p.

Ouyang, Y.; Li, J.; Dong, Y.; Blakely, L.V.; Cao, M.; - Genome- wide screening of genes required for *Listeria monocytogenes* biofilme formation. Journal of Biotech Research. Vol.4, 2012, 13-25p.

Palumbo, J.D.; Borucki, M.K.; Mandrell, M.E.; Gorski, L.; - Serotyping of *Listeria monocytogenes* by Enzyme-Linked Immonosorbent Assay and identification of Mixed-Serotype Cultures by Colony Immonoblotting. Journal of Clinical Microbiology. Vol.41, n<sup>o</sup>2, 2003, 564-571p.

Pan, Y.; Breidt, F.; Gorski, L. – Synergistic effects of Sodium Chloride, Glucose and Temperature on Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* Serotype 1/2a and 4b strains. Applied and Environmental Microbiology. Vol.76, n<sup>o</sup>5, 2010, 1433-1441p.

Park, S.F.; Stewart, G. – High-efficiency transformation of *Listeria monocytogenes* by electroporation of penicillin-treated cells. Gene. Vol. 94, 1990, 129-132p.

Peccio, A.; Autio, T.; Korkeala, H.; Rosmini, R.; Trevisani, M. – *Listeria monocytogenes* occurrence and characterization in meat-processing plants. Letters in Applied Microbiology. Vol. 37, 2003, 234-238p.

Pettit, R.K.; Weber, C.A.; Kean, M.J.; Hoffmann, H.; Pettit, G.R.; Tan, R.; Franks, K.S.; Horton, M.L. – Microplate Alamar Blue Assay for *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Susceptibility Testing. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 49, nº7, 2005, 2612-2617p.

Pilchová, T.; Hernould, M.; Prévost, H.; Demnerová, K.; Pazlarová, J.; Tresse, O. – Influence of food processing environments on structure initiation of static biofilm of *Listeria monocytogenes*. Food Control. Vol. 35, 2014, 366-372p.

Pita, J.S.M – Surto de listeriose entre 2009 e 2011 em Lisboa e Vale do Tejo – investigação e medidas implementadas pela ASAE. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa – Faculdade de Medicina Veterinária, 2012. 119p. Tese para obtenção do grau de mestre.

Pratt, L.A.; Kolter, R. – Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilme formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. Molecular Microbiology. Vol. 30, nº2, 1998, 285-293p.

Regulamento (CE) nº 1441/2007 da Comissão de 5 de Dezembro de 2007

Renier, S.; Hébraud, M.; Desvaux, M.; - Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: an additional facet of an opportunistic Gram-positive foodborn pathogen. Environmental Microbiology. Vol. 13, nº4, 2011, 835-860p.

Robinson, C; Matos, C; Beck, D; Ren, C; Lawrence, J; Valsisht, N; Mendel, S. – Transport and proofreading of proteins by the twin-arginine translocation (Tat) system in bacteria. Biochimica e Biophysica Act. Vol.1808, 2011, 876-884p.

Ryu, J.; Park, S.H.; Yeom, Y.S.; Shrivastav, A.; Lee, S.; Kim, Y.; Kim, H. - Simultaneous detection of *Listeria* species isolated from meat processed foods using multiplex PCR. Food Control. Vol. 32, 2013, 659-664p.

Sauvage, E.; Kerff, F.; Terrak, M.; Ayala, J.A.; Charlier, P. - The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. FEMS Microbial Rev. vol. 32, 2008, 234-258p.

Seeliger And Hohne, K. – Serotyping of *Listeria monocytogenes* and Related Species. In BERGAN, T.; NORRIS, J.R. *Methods in Microbiology*. 1<sup>st</sup> ed. London: Academic Press, 1979, vol. 13, 31-51 p.

Shobitz, R.; González, C.; Villarreal, K.; Horzella, M.; Nahuelquin, Y.; Fuentes, R. – A biocontroller to eliminate *Listeria monocytogenes* from the food processing environment. Food Control. Vol. 36, 2014, 217-223p.

Shoukat, S.; Malik, S.V.S.; Rawool, D.B.; Kumar, A.; Kumar, S.; Shrivastava, S.; Das, D.; Das, S.; Barbudhee, S.B.; - Comparison of indirect based ELISA by employing purified LLO and its synthetic peptides and cultural methods for diagnosis of ovine listeriosis. Small Ruminant Research. Vol. 113, 2013, 301-306p.

SNAPIR, Y.M.; VAISBEIN, E.; NASSAR, F.; - Low virulence but potentially fatal outcome – *Listeria ivanovii*. European Journal of Internal Medicine. Vol. 17, 2006, 286-287p.

Srey, S.; Jahid, I.K.; Ha, S.D. – Biofilm formation in food industries: a food safety concern. Food Control. Vol. 31, 2013, 572-585p.

Stepanovic, S.; Ciricovic, I.; Ranin, L.; Svabic-Vlaovic, M. – Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. Letters in Applied Microbiology. Vol. 38, 2004, 428-432p.

Stoodley, P.; Sauer, K.; Davies, D.G.; Costerton, J.W. – Biofilm as complex differentiated communities. Annu. Rev. Microbiol. Vol. 56, 2002, 187-209p.

Tide, C.; Harkin, S.R.; Geesey, G.G.; Bremer, P.J.; Scholz, W. – The influence of welding procedures on bacterial colonization of stainless steel weldments. Journal of Food Engineering. Vol. 42, 1999, 85-96p.

Vazquez-Boland, J.A.; Kuhn, M.; Berche, P.; Chakraborty, T.; Dominguez-Bernal, G.; Goebel, W.; Gonzalez-Born, B.; Wehland, J.; Kreft, J. – *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clinical Microbiology Review. Vol. 14, nº3, 2001, 584-640p.

Vitullo, M.; Grant, K. A.; Sammarco, M.L.; Tamburro, M.; Ripabelli, G.; Amr, C.F.L.; - Real time PCR assay for serotyping *Listeria monocytogenes* and differentiation from other *Listeria* spp. Molecular and Cellular Probes. Vol.27, 2013, 68-70p.

Watnick, P.I.; Lauriani, C.M.; Klose, K.E.; Croal, L.; Kolter, R. – The absence of flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* 0139. Molecular Microbiology. Vol. 39, nº2, 2001, 223-235p.

Weinmaier, T.; Riesing, M.; Ratteli, M.; Bille, J.; Arguedas-Villa, C.; Stephan, R.; Tasara, T. – Complete genome sequence of *Listeria monocytogenes* LL195, a serotype 4b strain from the 1983-1987 listeriosis epidemic in Switzerland. Journal. AMS.org. Vol. 1, 2013.

Wirtanen, G.; Salo, S. - Disinfection in food processing – efficacy testing of disinfectants. Reviews in Environmental Science and Biotechnonoly. Vol. 2, 2003, 296-306p.

Xavier, J.B.; Picioreanu, C.; Almeida, J.S.; Loosdrecht, M.C.M. – Monitorização e estrutura de biofilmes. Biomatemática – Modelação da estrutura de biofilmes. S.D

Zhao, T.; Doyle, M.P.; Zhao, P. – Control of *Listeria monocytogenes* in a Biofilm by a Competitive-Exclusion Microorganisms. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 70, nº7. 2004, 3996-4003p.

Zhou, Y.; Smith, D.; Chapman, M.R. – Promiscuous cross-seeding between bacterial amyloids promotes interspecies biofilms. Journal of Biological Chemistry. Vol. 287, nº42, 2012, 35092-35103p.

## 6. Anexos

LSD test; variable <b>CV 25 MWB</b> (Spreadsheet1) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00647, df = 10.000						
	Var1	{1} - .36700	{2} - .20167	{3} - .19733	{4} - .38483	{5} - .37700
1	3992c		0.030473	0.027212	0.791427	0.881964
2	4224c	0.030473		0.948675	0.019120	0.023465
3	4225c	0.027212	0.948675		0.017074	0.020952
4	4296c	0.791427	0.019120	0.017074		0.907387
5	4241c	0.881964	0.023465	0.020952	0.907387	

LSD test; variable <b>SS 25°C MWB</b> (Spreadsheet1) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 102E11, df = 10.000						
	Var7	{1} - 145E5	{2} - 9267E3	{3} - 8333E3	{4} - 1483E4	{5} - 104E5
1	3992c		0.072556	0.039631	0.900822	0.146970
2	4224c	0.072556		0.727851	0.058559	0.673079
3	4225c	0.039631	0.727851		0.031849	0.446456
4	4296c	0.900822	0.058559	0.031849		0.119957
5	4241c	0.146970	0.673079	0.446456	0.119957	

LSD test; variable <b>CV 25°C TSB</b> (Spreadsheet1) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00525, df = 10.000						
	NewVar3	{1} - .26333	{2} - .20567	{3} - .22033	{4} - .30383	{5} - .27467
1	3992c		0.352759	0.484072	0.509241	0.851940
2	4224c	0.352759		0.809252	0.128101	0.270631
3	4225c	0.484072	0.809252		0.188545	0.380110
4	4296c	0.509241	0.128101	0.188545		0.632714
5	4241c	0.851940	0.270631	0.380110	0.632714	

LSD test; variable <b>SS 25°C TSB</b> (Spreadsheet1) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 5960E7, df = 10.000						
	NewVar9	{1} - 1053E3	{2} - 115E4	{3} - 8767E2	{4} - 5033E2	{5} - 695E3
1	3992c		0.638186	0.396312	0.020165	0.102466
2	4224c	0.638186		0.200318	0.008811	0.045597
3	4225c	0.396312	0.200318		0.090596	0.383579
4	4296c	0.020165	0.008811	0.090596		0.358991
5	4241c	0.102466	0.045597	0.383579	0.358991	

LSD test; variable **CV 37°C TSB** (Spreadsheet1) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00153, df = 10.000

	<b>V21</b>	<b>{1} - .33767</b>	<b>{2} - .23300</b>	<b>{3} - .25167</b>	<b>{4} - .38800</b>	<b>{5} - .35967</b>
<b>1</b>	3992c		0.008325	0.022585	0.146081	0.506559
<b>2</b>	4224c	0.008325		0.571825	0.000668	0.002659
<b>3</b>	4225c	0.022585	0.571825		0.001639	0.006981
<b>4</b>	4296c	0.146081	0.000668	0.001639		0.395803
<b>5</b>	4241c	0.506559	0.002659	0.006981	0.395803	

LSD test; variable **SS 37°C TSB** (Spreadsheet1) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 5186E6, df = 10.000

	<b>NewVar19</b>	<b>{1} - 1695E2</b>	<b>{2} - 1442E2</b>	<b>{3} - 1608E2</b>	<b>{4} - 188E3</b>	<b>{5} - 1958E2</b>
<b>1</b>	3992c		0.675724	0.885752	0.759512	0.663810
<b>2</b>	4224c	0.675724		0.782616	0.473148	0.400192
<b>3</b>	4225c	0.885752	0.782616		0.653956	0.564910
<b>4</b>	4296c	0.759512	0.473148	0.653956		0.896662
<b>5</b>	4241c	0.663810	0.400192	0.564910	0.896662	

LSD test; variable **CV 37°C MWB** (Spreadsheet1) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .00550, df = 10.000

	<b>Var9</b>	<b>{1} - .56067</b>	<b>{2} - .37200</b>	<b>{3} - .37000</b>	<b>{4} - .54567</b>	<b>{5} - .51067</b>
<b>1</b>	3992c		0.010949	0.010351	0.809352	0.428188
<b>2</b>	4224c	0.010949		0.974300	0.016720	0.045001
<b>3</b>	4225c	0.010351	0.974300		0.015800	0.042540
<b>4</b>	4296c	0.809352	0.016720	0.015800		0.576016
<b>5</b>	4241c	0.428188	0.045001	0.042540	0.576016	

LSD test; variable **SS 37°C MWB** (Spreadsheet1) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 6114E6, df = 10.000

	<b>NewVar5</b>	<b>{1} - 1027E2</b>	<b>{2} - 10400.</b>	<b>{3} - 5733.3</b>	<b>{4} - 65567.</b>	<b>{5} - 51317.</b>
<b>1</b>	3992c		0.179003	0.159905	0.574034	0.439924
<b>2</b>	4224c	0.179003		0.943172	0.407791	0.536008
<b>3</b>	4225c	0.159905	0.943172		0.370749	0.491569
<b>4</b>	4296c	0.574034	0.407791	0.370749		0.827873
<b>5</b>	4241c	0.439924	0.536008	0.491569	0.827873	

LSD test; variable Var1 (Spreadsheet1) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,00736,  
df = 8,0000

	<b>3992 CV</b>	<b>{1} - ,26333</b>	<b>{2} - ,36700</b>	<b>{3} - ,33767</b>	<b>{4} - ,56067</b>
<b>1</b>	25°C TSB		0,177267	0,319721	0,002824
<b>2</b>	25°C Mwb	0,177267		0,686491	0,024523
<b>3</b>	37°C TSB	0,319721	0,686491		0,012946
<b>4</b>	37°C MWB	0,002824	0,024523	0,012946	